

dc_349_11

1

MTA Doktori Értekezés Tézisei

A hippocampus gátló neuronhálózatainak átalakulása temporális lebeny eredetű epilepsziában

Maglóczky Zsófia

MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
Celluláris- és Hálózat-Neurobiológiai Osztály
Agykéreg Kutatócsoport
Budapest, 2012

Rövidítések jegyzéke

ABC: avidin-biotin-tormaperoxidáz komplex
AIS: axon iniciális szegmentum
BSA: szarvasmarha szérúm-albumin
CA: cornu Ammonis
CB: calbindin
CB1-R: 1. típusú cannabinoid receptor
CCK: cholecystokinin
CR: calretinin
DAB: 3,3'-diaminobenzidín-4HCl
g: glia
GABA: γ -amino-vajsav
GD: gyrus dentatus
GFAP: gliális fibrilláris savas protein
GluR2/3: glutamát receptor 2/3 alegyége
h: hilus
HE: humán epilepsziás
HK: humán kontroll
NK1: neurokinin –1
NPY: neuropeptid Y
PB: foszfát puffer
pm: post mortem
PV: parvalbumin
s.g.: stratum granulosum
s.lm.: stratum lacunosum-moleculare
s.m.: stratum moleculare
s.o.: stratum oriens
s.p.: stratum pyramidale
s.r.: stratum radiatum
SOM: somatostatin
SP: substance P
SPR: substance P receptor
str.: stratum
TB: TRIS puffer
TBS: TRIS-sel pufferelt fiziológiás sóoldat
TL: temporális lebeny
TLE: temporális lebeny eredetű epilepszia
vGlut1: vezikuláris glutamát transzporter

I. BEVEZETÉS

I/1.A temporális lebeny eredetű epilepszia

Az epilepszia az egyik leggyakoribb neurológiai elváltozás, mely sokféle formában és tünetegyüttesel jelenik meg, jelentős károsodásokat idéz elő a betegek életminőségében és életvitelében (Halász & Rajna, 1990; Meldrum, 1990). Minden megjelenési formájára jellemző, hogy roham alatt az agy különböző területein vagy az egész agyra kiterjedően rendellenes EEG tevékenység észlelhető (Schwartzkroin & Wheal, 1984), mely az adott terület hiperaktivitására utal, nagyszámú sejt szinkron tüzel, és bizonyos sejtcsoportok kiterjedten pusztulnak (Falconer *et al.*, 1964; Engel, 1996). A beteg kognitív képességei – tanulás, memória – sérülhetnek (Miller *et al.*, 1993). Gyakorisága a teljes népességre nézve 1-2% körüli, gyermekkorban gyakoribb (Halász & Rajna, 1990). Az utolsó 20-30 évben megnőtt az időskori epilepsziás megbetegedések gyakorisága is (Faught, 1999; Leppik, 2007), az okokat még vizsgálják. Az időskori neurodegeneratív kórképek palettája így egy újabb betegséggel bővült, tovább növelve az időskori betegellátásra nehezedő nyomást.

Az epilepszia betegséget régebben generalizált és fokális csoportokra osztották, és megkülönböztettek genetikai, szimptomás és kriptogén epilepsziákat, eredetük szerint (League & Epilepsy, 1989)(ILAE 1989). Azonban az elektrofiziológiai vizsgálómódszerek fejlődése, a mágneses magrezonancia segítségével történő képalkotás finomodása, a rohamszemiológiai ismeretek bővülése valamint az emberi genom feltérképezése, és a genetikai eredetű epilepsziákról halmozódó ismeretek gyakorlatilag „felrobbantották” ezt az egyszerű csoportosítást (Berg *et al.*, 2010). A jelenlegi csoportosításban is megmaradt azonban a temporális lebeny eredetű epilepszia, a felnőttkori fokális epilepszia leggyakoribb formája, mely különböző szimptomás okokra vezethető vissza, ugyanis nem sikerült olyan genetikai faktorokat találni, amelyek egyértelműen összefüggésbe hozhatóak lennének a temporális lebeny eredetű epilepsziával. A legelterjedtebb vélekedés szerint „epilepsziára fogékony” gének húzódnak meg a háttérben (Salzmann *et al.*, 2008; Peternel *et al.*, 2009), melyek bizonyos körülmények között elősegíthetik epilepszia betegség kialakulását. A vélekedést az is indokolja, hogy epilepsziás betegek anamnézisében gyakran szerepel fejét ért baleset, lázgörcs, fertőző betegségek, ikerterhesség vagy egyéb perinatalis ártalom (Rocca *et al.*, 1987; Lewis, 2005). Ezek önmagukban nem váltanak ki epilepsziát, de egyes embereket – több más tényezővel együtt – fogékonyá tehetnek a betegség kialakulására. A legvalószínűbb, hogy környezeti tényezők és a teljes genom összjátéka alakítja ki a betegséget.

Felnőtt korban a temporális lebeny eredetű epilepszia (TLE) a leggyakoribb. Noha jelenleg sokféle gyógyszer van forgalomban, a betegek 25-30%-a nem reagál a kezelésre. Gyógyszerrezisztens TLE esetén, epilepszia-sebészet alkalmazásával a betegek jelentős hányadának állapota javítható (Falconer & Taylor, 1968; Spencer & Spencer, 1994).

Epilepsziás betegek agyában a görcsöket feltehetően bizonyos pályákon érkező, abnormális serkentés, illetve serkentő rekurrens pályákon keresztüli abnormális reverberáció okozza, és ez az oka az érzékeny sejtek pusztulásának is (Olney *et al.*, 1986; Engel, 1996).

A post mortem epilepsziás emberi agyak tanulmányozása során kiderült, a felnőttkori fokális epilepsziák jelentős része temporális lebeny eredetű (Falconer *et al.*, 1964; Green, 1991; Meldrum, 1991), és elsősorban a limbikus rendszer struktúráiban, a hippocampusban, entorhinális, temporális, perirhinális kéregben, amygdala magvakban, egyes mediális thalamus magvakban, habenulában okoz sejtpusztulást (Corsellis & Meldrum, 1976; Gumnit, 1983; Green, 1991), - mely megmagyarázza, hogy epilepsziás betegek tanulási és kognitív képességei miért szenvednek gyakran károsodást (Rodin, 1968; Miller *et al.*, 1993).

Az epilepszia gyógyszeres kezeléssel nem gyógyítható, csak tünetmentesíthető (Halász & Rajna, 1990), és a kezelés költségei jelentős terhet rónak a társadalomra. Számos állatkísérletes modellt hoztak létre az epilepszia tanulmányozására, azonban egyik modell sem tükrözi mindazon változások összességét, amelyet humán agyban leírtak. Ezért elengedhetetlen az epilepszia vizsgálatánál a humán minták minél komplexebb vizsgálata, mert csak ez teszi lehetővé a valódi betegség jelenségeinek megismerését. Ez az ismeret viszont hozzájárul pontosabb, realisztikusabb epilepszia modellek kifejlesztéséhez is, miáltal a betegség patomechanizmusa kísérletesen is tanulmányozhatóvá válik.

Csoportunk 1994. óta vesz részt az Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet (mai nevén: Országos Idegtudományi Intézet), az Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet (2007-ben jogutód nélkül megszüntették) és a MÁV Kórház Idegsebészeti Osztálya között létrejött Epilepszia Sebészeti Programban, és folytat vizsgálatokat a terápiarezisztens temporális lebeny epilepsziás betegekből eltávolított hippocampális szövetmintákon. Jelen tanulmányban az emberi hippocampusban talált funkcionális morfológiai elváltozásokat fogom bemutatni, elsősorban a gátló neuronhálózatok átalakulását részletezve.

I./2. Az emberi hippocampus szerkezete

A hippocampus ősi kéregterület, mely többek között részt vesz a memórianyomok kialakításában, a tanulásban, a térbeli tájékozódásban, és kiterjedt külső-belső kapcsolatai révén jelentős szerepet játszik az emlékek viselkedésének és alkalmazkodásának szabályozásában (Duvernoy, 1998).

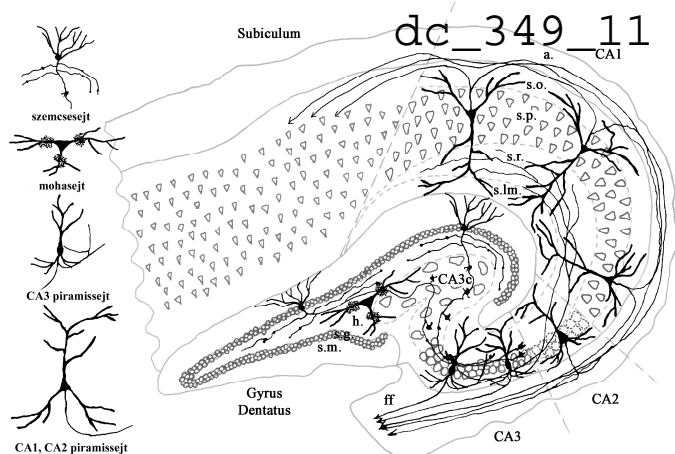
A főemlősök hippocampusja jóval fejlettebb és bonyolultabb, mint a rágcsálóké. Az emberi hippocampus három részre osztható: a fejre, vagy anterior szegmensre, amely a digitationes hippocampit tartalmazza, a hippocampus testre, vagy középső szegmensre, és a farokra, vagy posterior szegmensre (Duvernoy, 1998). Maga a hippocampus vagy hippocampális formáció két részből, a cornu Ammonisból és a gyrus dentatusból áll úgy, hogy a rétegek két, egymásba forduló C alakot képeznek (Duvernoy, 1998).

A cornu Ammonis fő tömegét a piramis sejtek adják, és további 3 fő régióra osztható: CA1, CA2, CA3 (Nó, 1934; Seress, 1988; Amaral *et al.*, 1990) melyeket a bennük elhelyezkedő principális sejtek morfológiája és kapcsolatrendszere alapján lehet elkülöníteni. A piramis sejtek sejttestjei alkotják a stratum pyramidalet. Apikális dendritjeik a stratum radiatumba majd a stratum lacunosum-moleculareba futnak, bazális dendritjeik a stratum oriensben ágaznak el. A gyrus dentatus fő tömegét a kompakt szemcsesejtréteg adja, dendritfájuk a stratum moleculareban helyezkedik el. A szemcsesejtek alatt helyezkedik el a hilus, ide futnak a szemcsesejtek axonjai, a moharostok. A hilust és a cornu Ammonis CA3c régióját együtt endfoliumnak is nevezik (Sommer, 1880; Amaral *et al.*, 1990; Duvernoy, 1998). A szakirodalomban előfordul, hogy nem a CA3c-hilus elnevezést használják, hanem ehelyett CA4-polimorf réteg felosztás szerepel (Duvernoy, 1998). A CA3c+hilus, illetve a CA4+polimorf réteg megfelel az endfoliumnak. A hilus határai szélesebbek, tartalmazzák az összes mohasejtet és számos interneuront, a CA3c-ben csak CA3 piramis sejtek és interneuronok taklálhatók. A polimorf réteg keskenyebb, és csak a mohasejtek egy részét tartalmazza. Azonban, ahogy arra Seress László is felhívta a figyelmet könyvfejezetében (Seress, 2005), Amaral szerint (Amaral, 1978) a hilus elnevezés jobban megfelel, mert jelzi, hogy ez a terület nem az Ammonsarv része. Ezért mi is ezt a nevezéktant használtuk közleményeinkben. A hilusban a mohasejtek a principális neuronok. A mohasejteken komplex, elágazó tüskék vannak, melyek a szemcsesejtek axonjaitól kapják fő bemenetüket, axonjuk a szemcsesejtek dendritjén és tüskéin végződnek a stratum moleculare belső harmadában. Érdeemes megjegyezni, hogy nem azokon a szemcsesejteken végződnek, melyek axonterminálisai őket beidegzik, hanem ezektől térben eltolva, caudálisan elhelyezkedő szemcsesejteket látnak el axonjaikkal (Amaral DG, 1990). A principális sejtek serkentőek, neurotranszmitterük a glutamát.

A hippocampus principális sejtjei szoros kapcsolatban vannak egymással. A szemcsesejtek axonjai idegzik be a mohasejteket a hilusban, valami végződnek a CA3 piramisokon, a CA3c kivételével szoros köteget alkotva a stratum lucidumban. A CA3 a,b régió piramisai a CA2 és CA1 régió piramisain végződnek, ezt az axonpályát Schaffer kollaterálisoknak nevezik, valamint jól fejlett lokális axonkollaterálisokkal beidegzik egymást is, ami szokatlan a principális sejtek esetében (Amaral & Witter, 1989; Amaral DG, 1990). A CA1 régió piramis sejtjei a subiculumba vetítenek, mely az entorhinalis kéregbe küld axonokat, az entorhinalis kéreg piramis sejtjei pedig visszavetítenek a gyrus dentatus szemcsesejtjeire, és a CA3-CA1 piramis sejtjeire (Amaral & Witter, 1989).

Az emberi hippocampus szerkezete és kapcsolatrendszerei számos vonatkozásban eltérnek a rágcsálókétól, itt most csak néhány, a dolgozat szempontjából jelentős különbségre hívom fel a figyelmet:

1. A szemcsesejtek mintegy 20%-ának vannak bazális dendritjei, melyek a hilusba nyúlnak, és bemenetet kapnak a mohaterminálisoktól (Seress & Mrzljak, 1987). Ez azért jelentős, mert ezáltal a szemcsesejtek képesek serkenteni egymást közvetlenül, nem csak más



sejteken (pld. mohasejtek) vagy áttételesen axonpályákon keresztül (Seress & Mrzljak, 1987; Seress, 2005).

2. Az Ammonszarv piramissejtjei lazán, több rétegben egymás fölött helyezkednek el a CA1 régióban, vastag réteget alkotva, így a rétegbe érkező pályák sokkal heterogénebben végződnek a sejtek különböző kompartmentumain, mint sejttest és proximális dendritek, mivel a sejttestek nem alkotnak szoros, kompakt réteget (Duvernoy, 1998).

3. A CA2 régió széles és sokkal kiterjedtebb, mint a rágsálóké. Ennek a hippocampus longitudinális szerveződésében van szerepe, ami ezáltal valószínűleg sokkal hatékonyabb, mint rágsálókban (Duvernoy, 1998).

4. A két hippocampális féltéke emberben csak minimális mértékben van direkt commissurális pályákon keresztül összekapcsolva (Amaral *et al.*, 1984; Wilson *et al.*, 1990; Gloor *et al.*, 1993). A két hippocampális féltéke más-más memória funkciókban érintett (Szirmai, 2001). A domináns oldali hippocampus elsősorban a beszédértés, szavak felidézése, visszamondása, mese szüzségének megjegyzése funkciókért felelős, míg a szubdomináns oldali hippocampális féltéke a vizuális készségekben, arcfelismerés, képek térbeli forgatása, mese részleteinek felidézése, vesz részt (Szirmai, 2001). Ez a tény teszi lehetővé, hogy epilepszia műtétek esetén az egyik oldali hippocampust eltávolítsák, mivel a másik hippocampus függetlenül is tud működni, és idővel a tapasztalatok szerint – részben – képes átvenni az eltávolított hippocampális féltéke funkcióit.

A hippocampus sejttypusait, alrégióit és főbb pályarendszereit az 1. ábra foglalja össze.

1. Ábra: A hippocampus főbb sejttypusai és pályarendszerei (Wittner, 2004, PhD dolgozat, a szerző szíves engedelmével) A hippocampus alrégióinak jelölését (Cornu ammonis - CA) Lorente de No szerint adtuk meg, Amaral szerint módosítva (Seress 1988). A hippocampus fő bemenetét az entorhinális kéregből kapja, mely serkentő rostokat küld elsősorban a gyrus dentátus szemcsesejtjeire, és közvetlenül a CA3 és a CA1 terület piramissejtjeire is. A gyrus dentatus szemcsesejtjeiből erednek a moharostok, melyek a CA3 régió piramissejtjein végződnek, és serkentik azokat. A CA3 piramissejtek axonjai a CA1 piramissejtekre vetülnek, szintén serkentve azokat. A CA3 piramissejtek visszakanyarodó kollaterálisai egyedülállóan sűrűn végződnek más CA3 piramissejteken is. A CA1 piramissejtek a

subiculum principális sejtjein végződnek, a subiculum pedig visszavetíti az entorhinális kéregbe, így záródik az entorhinális-hippocampális szinaptikus kör.

I/2.1. A nem-principális sejtek

A hippocampus minden régiójában találhatók nem-principális neuronok is, melyek kis hányaduk (10-16%) ellenére funkcionálisan igen jelentősek (Freund & Buzsáki, 1996). Sejttestjeik bármely rétegben elhelyezkedhetnek, axonjaik lokálisan arborizálnak, dendritjeiken többnyire nem található tüske, és az ingerületátvivő anyaguk legtöbb esetben az idegrendszer fő gátló hatású transzmittere, a gamma-aminó-vajsav (GABA). Dúsan elágazó lokális axonfájukon keresztül képesek a principális sejtek nagy csoportjainak aktivitását szabályozni (Acsády *et al.*, 1996; Freund & Buzsáki, 1996).

Hagyományosan a helyben elágazó sejteket interneuronoknak nevezzük, és mivel ezek többnyire GABÁ-t tartalmaznak, a szakirodalom gyakran hivatkozik a kérgi gátlósejtekre úgy, mintha azok valamennyien interneuronok lennének, illetve az interneuronokat azonosítja a GABAerg sejtekkel. Azonban kiderült, hogy a lokális axonelágazódású sejtek nem mindig GABAergek, és egyes GABA-tartalmú sejtek az agy távoli területeire vetítenek el (Seress & Ribak, 1983; Toth & Freund, 1992; Freund & Buzsáki, 1996). Csak szűkebb értelemben igaz az, a sejtek többségére, de nem mindre, hogy a lokális axonelágazódású sejtek "GABAerg interneuronok".

Jelen dolgozatban az "interneuron" elnevezést ebben a szűkebb értelemben használom, és helyi axonelágazódású gátlósejtet értek alatta.

I./2.2. Az interneuronok funkcionális csoportosítása

A patkány hippocampuson végzett komplex morfológiai és fiziológiai vizsgálatok igazolták, hogy a gátlósejtek morfológiai és neurokémiai sajátosságai alapján funkcionális csoportokba sorolhatók, melynek alapján meghatározható az adott sejt neuronhálózatban betöltött szerepe. Így vannak a periszomatikus régió gátlásáért, a dendritikus régió gátlásáért, és más interneuronok gátlásáért felelős sejtek (Freund & Buzsáki, 1996). E három csoport együttes működésének, és a régióba érkező subcortikális-corticalis pályarendszerek hatásának összegződése fogja meghatározni egy régió principális sejtjeinek aktivitását (Freund & Buzsáki, 1996). A neuronhálózati hatások még kiegészülnek az egyedi sejtek szintjén, a sejten belüli szignalizációs és enzimrendszerek módosulásával, illetve a sejten és a terminálosokon lévő receptorok regulációjával (Lloyd *et al.*, 1986; Isokawa & Mello, 1991; Mathern *et al.*, 1998a).

Az ismeretek akkumulációja és különböző technikák kombinációja ma már lehetővé teszi, hogy a sejtek egyedi és neuronhálózati működéséről összetett képet nyerjünk – patkányban. Jelentős hiányosságok mutatkoznak azonban az emberi hippocampus megváltozásának ismeretében kóros körülmények között. Számos alkalommal vizsgálták

egyes neurokémiai markerek (Babb *et al.*, 1989; de Lanerolle *et al.*, 1989; Sloviter, 1989; Sundstrom *et al.*, 2001), vagy receptorok, transzmitterek szintjének és eloszlásának változását (Olney, 1978; Avoli, 1991; de Lanerolle *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 1992) (de Lanerolle *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 1992; Mathern *et al.*, 1998b; Mathern *et al.*, 1999) – de általában nem vizsgálták neuronhálózatban betöltött szerepét.

A gátló interneuronokat funkcionálisan 3 fő csoportba sorolhatjuk (Freund & Buzsaki, 1996). Két sejtípus a principális neuronokat innerválja. A periszomatikus gátlósejtek (kosársejtek és axo-axonikus sejtek) a principális sejtek sejttestjét, és proximális dendritjeit (Kosaka *et al.*, 1987) (kosársejtek) valamint axon iniciális szegmentumát (Somogyi *et al.*, 1983) (axo-axonikus sejtek, vagy ahogy Szentágothai professzor nevezte őket: chandellier sejtek) idegzik be, és a fősejtek kimenetét kontrollálják (Freund & Katona, 2007). A másik típus a dendritikus gátlósejtek csoportja, melyek a dendritikus régió különböző részeit innerválják, és valószínűleg a dendritekre beérkező serkentést és annak a sejttestig való eljutását befolyásolják (Freund & Buzsaki, 1996; Halasy *et al.*, 1996). A harmadik típus nem principális sejteken, hanem más interneuronokon végződik, gátlósejteket gátol (interneuron-szelektív sejt) (Gulyas *et al.*, 1996). A három típus nem csak funkcionálisan, de neurokémiailag is elkülönül, GABA mellett különböző kalciumkötő fehérjék és neuropeptidek vannak bennük, így vizsgálatuk morfológiailag is lehetséges a megfelelő markerrel történő immunfestés segítségével (Freund & Buzsaki, 1996).

Az első táblázat mutatja be az egyes funkcionális interneuron típusokban jelenlévő neurokémiai markereket, kalciumkötő fehérjéket, neuropeptideket és receptorokat, melyeket felhasználtunk a sejtípusok azonosítására.

1. Táblázat. Az emberi hippocampus gátlósejtjeinek funkciói az őket jelölő marker alapján

Neurokémiai marker	Hippocampális interneuron típus	Forrás
PARVALBUMIN Kalciumkötő fehérje	Kosár- és axo-axonikus sejt, periszomatikus gátlás	(Kosaka <i>et al.</i> , 1987) (Somogyi <i>et al.</i> , 1983)
CALBINDIN Kalciumkötő fehérje	Dendritikus gátlás, + axo-axonikus sejtben, részben periszomatikus gátló, az általunk talált adatok alapján	(Seress <i>et al.</i> , 1991) (Wittner <i>et al.</i> , 2002) (Sloviter <i>et al.</i> , 1991)
CALRETININ Kalciumkötő fehérje	Saját adatunk alapján: Dendritikus és interneuron specifikus gátlás,	(Urban <i>et al.</i> , 2002) (Nitsch & Leranth, 1993; Nitsch & Ohm, 1995)

KOLECISZTOKININ Neuropeptid	periszomatikus gátlás	(Lotstra & Vanderhaeghen, 1987) (Katona <i>et al.</i> , 2000)
SZOMATOSZTATIN Neuropeptid	Dendritikus gátlás	(Chan-Palay, 1987)
NEUROPEPTID Y Neuropeptid	Dendritikus gátlás	(Chan-Palay <i>et al.</i> , 1986)
P ANYAG RECEPTOR	Saját adatunk alapján: dedritikus gátlás+ismeretlen	(Toth <i>et al.</i> , 2007)
1. TÍPUSU CANNABINOID RECEPTOR	Dendritikus és periszomatikus gátlás	(Katona <i>et al.</i> , 2000)

I./3. A hippocampális sejtpusztulás általános jellemzői temporális lebeny eredetű epilepsziában

Principális sejtek érzékenysége: A humán hippocampusban epilepszia hatására kialakuló sejtpusztulási mintázatot Sommer (Sommer, 1880) írta le először: legérzékenyebbnek a hippocampus CA1 régió piramissejtjei bizonyultak, valamint az endfólium sejtejei (mohasejtek, CA3c piramissejtek és hiláris interneuronok). A limbikus struktúrákban (amygdala, entorhinális, perirhinális kérgék, habenula, középvonali thalamus magvak, temporális kérgi területek) szintén megfigyeltek neuronhálózat szintű elváltozásokat (Ben-Ari, 1987; 2001). A leggyakoribb és legszembeötlőbb epilepszia okozta elváltozás a hippocampusban a CA1 és CA3c régió piramissejtjeinek nagyarányú pusztulása, melyet egyes interneuronok pusztulása és a glia elemek mennyiségének megszaporodása (gliosis) kísér, a kórképet hippocampális sclerosisnak nevezik (Margerison & Corsellis, 1966a; Margerison & Corsellis, 1966b). A scleroticus hippocampus atrófiás lesz, a CA1 régió nagyarányú sejtvesztése miatt a sejtrétegek nem különíthetők el többé, a strata pyramidale, radiatum és oriens összemosódik, csak a stratum lacunosum-moleculare különül el. A mohasejtek és CA3c piramissejtek egy része megőrződik, de jelentős részük hiánya miatt az endfólium sejtállománya megritkul.

A gátlósejtek érzékenysége: A gátlósejtek túlnyomó többsége megőrződik az epilepsziás hippocampusban (Babb), azonban vannak speciális sejtcsoportok, calretinin (CR)- és somatostatin (SOM)- valamint Neuropeptid Y (NPY)-tartalmú gátlósejtek, melyek

érzékenyek és epilepszia hatására elpusztulnak állatkísérletes modellben. Emberben leírták a SOM és NPY-tartalmú interneuronok axonsarjadzását is a sejtpusztulás mellett. Ezek a sejtek a hilusban vannak nagy tömegben jelen, ezért a megfigyelt hiláris interneuron pusztulás egy részét ezeknek a sejteknek az eltűnése okozza. A calbindin (CB)-tartalmú és cholecystokinin (CCK)-tartalmú sejtek rezisztenciájáról számoltak be mind állatkísérletes epilepszia modellekben, mind emberi hippocampuson végzett vizsgálatokban, míg a parvalbumin (PV)-tartalmú interneuronokat munkánk megkezdése előtt egyesek nagyon érzékenynek találták epilepsziára, míg mások megőrződéséről számoltak be. Még egy sejtípust vizsgáltunk, aminek neurokémiai sajátossága, hogy P anyag receptort fejez ki a felszínén (SPR-kifejező sejtek), ezeket nem vizsgálták emberi epilepsziában munkánk előtt.

Az emberen végzett vizsgálatok gyakori hiányossága, hogy a változásokat csak fénymikroszkópos szinten vizsgálják, és a sejtek közötti kapcsolatokat, a szinaptikus átrendeződést nem kutatják. Holott, emberi mintákon az egyes sejtípusok funkciójára csak a sejtek végződési mintázata alapján lehet következtetni, hiszen *in vivo* vagy *in vitro* fiziológiai vizsgálatra vagy sejtöltésre pld. kontroll minták esetében nincsen lehetőség. A sejtek axonterminálisainak posztszinaptikus elemeiből azonban következtetni lehet, hogy periszomatikus vagy dendritikus gátlásban vesz-e részt az adott neurokémiai azonosított sejtípus. Gyakran azért sem végeznek ilyen vizsgálatokat, mert nehéz megfelelő megőrzöttségű kontroll agyszövethez jutni, mely elektronmikroszkópos vizsgálatokra, különösen kvantitatív analízisre megfelelő lenne. Ily módon viszont csak rendkívül hiányos adatok állnak rendelkezésre az emberi szövetből, melyeket gyakran rossz megőrzöttségű kontroll mintákkal való összehasonlításokra alapoztak. Az állatkísérletes epilepszia modellekből származó adatok viszont pont az alapkérdésre nem tudnak választ adni: vajon a vizsgált jelenség megfelel-e annak, ami az epilepsziás emberek agyában történik.

Ezért célul tűztük ki az epilepsziás reorganizáció vizsgálatát temporális lebeny eredetű epilepsziában, hogy kvantitatív elektronmikroszkópos vizsgálatokkal feltárjuk a funkcionálisan különböző gátlósejtek számában, eloszlásában és kapcsoltaiban bekövetkező változásokat, és ezek lehetséges szerepét a neuronhálózat működésének epilepsziában bekövetkező funkciózavarában.

II. A TANULMÁNY CÉLKITŰZÉSEI:

Az epilepsziás rohamokat sok sejt szinkron kisülése okozza, melyért a legvalószínűbb hipotézis szerint az elégtelen gátlás felelős. A principális sejtek aktivitását lokális gátló interneuronok szabályozzák, melyek három funkcionális csoportba sorolhatók: periszomatikus gátlósejtek, dendritikus gátlósejtek, valamint más interneuronokon végződő interneuron-szelektív sejtek. A sejteket különböző neurokémiai markerek jelölik.

Ezeket a sejteket emberi hippocampusban nem vagy nem elég részletesen vizsgálták, sem kontroll alanyokban, sem temporális eredetű epilepsziás betegek műtétilag eltávolított hippocampusában, így szinaptikus reorganizációjukról és bemeneteik változásairól nem állt rendelkezésre elég adat ahhoz, hogy célzott, a neuronhálózat működését szabályozó gyógyszereket fejlesszünk.

Ezért a következő célokat tűztük ki:

1. Új immerziós fixálási módszer kidolgozása az emberi hippocampus post mortem és reszekciós mintáinak reprodukálható elektronmikroszkópos vizsgálatára
2. Az emberi hippocampus neurokémiaailag azonosított gátlósejtjeinek funkcionális csoportosítása kvantitatív elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével, hogy ellenőrizzük, a patkányban már ismert funkciójú gátlósejtek ugyanazt a funkciót látják-e el emberi hippocampusban
3. Dendritikus és periszomatikus gátlásban résztvevő sejtek érzékenységének és szinaptikus reorganizációjának vizsgálata epilepsziás betegek műtétilag eltávolított hippocampusában, az epilepsziában elégtelenül működő gátlás neuronhálózati hátterének és patomechanizmusának feltárására.
4. A a gátlósejtek szinaptikus reorganizációjának összevetése az epilepsziás betegek hippocampusában található principálisajt pusztulással, annak megértésére, vajon a gátló neuronhálózatok átalakulása milyen szerepet játszik az epilepsziás sejtpusztulás kialakulásban

III. ANYAG és MÓDSZER

A PV, CB és CR-tartalmú valamint SPR-t és CB1-R-t expresszálo interneuronok morfológiai változásait vizsgáltuk 104 gyógyszerrezisztens temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő magyar, és 28 amerikai páciens agyából műtéti úton eltávolított és 11 kontroll humán agyból származó hippocampusban.

A felhasználásra kerülő kontroll idegszövetet a Lenhossék program bocsájtotta rendelkezésünkre, olyan elhunytakból származik, akiknek neurológiai megbetegedése nem volt. A kontroll személyek életkora 37 és 78 év között változott. A boncolást a Semmelweis Egyetem Igazságügyi Kórbonctani Intézetében hajtották végre, az Egészségügyi Minisztérium és a Helsinki Deklaráció rendelkezéseinek megtartásával. A post mortem idő a vizsgálatba bevont kontroll idegszövet esetében 2-4 óra volt, kivéve abban az esetben, amikor a hosszú post mortem idő hatását vizsgáltuk, akkor 8-10 órás mintákat használtunk. Az epilepsziás idegszövetet terápiarezisztens temporális lebeny epilepsziában szenvedő betegek műtétielt eltávolított hippocampusa (elülső egyharmad) képezte. A vizsgálatokat a Kutatásetikai Bizottság rendelkezéseinek megtartásával (TUKÉB 5-1/1996, kiterjesztve 2005) végeztük. A vizsgált epilepsziás anyag egy részét a csoportunkkal kollaborációban dolgozó Buzsáki György professzortól kaptuk, a műtéteket a New York University, School of Medicine-en végezték. A páciensek másik részét az Országos Idegsebészeti Tudományos Intézetben valamint a MÁV Kórházban műtötték. A betegek egy írásos beleegyező nyilatkozat adtak a műtét előtt, hogy tudományos célokra felhasználható az eltávolításra került szövet. Az összehasonlító és kvantitatív vizsgálatokhoz a hippocampus ugyanazon anterio-posterior kiterjedéséből származó régiót használtuk fel. Kihagytuk a kvantitatív vizsgálatokból a tumor-asszociált epilepsziában szenvedő betegek adatait.

III./1. Fixálás

A sebészi eltávolítás után a hippocampust 4-5 mm széles blokkokra vágtuk, és 4% paraformaldehidet, 0.05% glutáraldehidet és 0.2% pikrinsavat tartalmazó 0.1M (PB) alapú fixáló oldatba helyeztük (pH=7,2-7,4). Az agyszövetet fixáló oldatban rázógépre helyeztük, a fixálót 6 órán keresztül, minden félórán friss oldatra cseréltük, majd a blokkokat egy éjszakán keresztül ugyanabban a fixáló oldatban, de glutáraldehid nélkül utófixáltuk (Magloczky *et al.*, 1997). A 11 kontroll agyból nyolcat ugyanennek a fixálási folyamatnak vetettünk alá. A másik három kontroll agyat (HK2, HK10 és HK11) a halál beállta után két órával a koponyából kisedve, a két-két arteria carotis internán, illetve vertebralison keresztül perfundáltuk, először fiziológiás sóoldattal (2 liter, 30 percen keresztül), majd fixáló oldattal, amely 4% paraformaldehidet és 0,2% pikrinsavat tartalmazott 0,1M PB-ben (4 liter, 1,5 órán keresztül). A hippocampust ezek után kivettük, 4-5 mm vastagságú blokkokra vágtuk,

melyeket ugyanabban a fixáló oldatban, de glutáraldehid nélkül utófixáltunk egy éjszakán át, 4 C fokon.

III./2. Immuncitokémia

III./2.1. Egyszerű immunfestés

A foszfát pufferes mosások után TBS-be (TRIS-szel pufferelt fiziológiás sóoldat, pH=7.4) helyeztük át a metszeteket az inkubálás további lépéseihez, mivel a továbbiakban minden szérumot TBS-ben hígítottunk, és az egyes inkubációs lépések között TBS-sel (3X10 perc) mostuk a metszeteket. Az endogén peroxidáz blokkolására H₂O₂ 1%-os oldatát tettük a metszetekre, 10 percre. TBS-ben történő mosás után blokkoló anyagot (5%-os tejpor és 2% BSA keveréke) tettünk a metszetekre, 1 órára, a nem specifikus fehérje kötés csökkentése érdekében. Ezt követte a primer szérumokban történő inkubáció 2 napig, 4°C-on. (Kalciumkötő fehérjék: parvalbumin (PV), calbindin (CB), calretinin CR), Substance P receptor (SPR), glutamát receptor 2-3 alegysége (GluR2/3), glial fibrillar acidic protein (GFAP), CB1 cannabinoid receptor (CB1-R),olecisztokinin (CCK), somatostatin (SOM), neuropeptid Y (NPY), vezikuláris glutamát transzporter 1 (vGlut1), Nuclearis neurofilament N (NeuN).

Ezután a primer szérumot felismerő biotinilált szekunder szérumot tettünk a metszetekre 2 órára (Vectastain kit, Vector; 1:250). Ezt követte az avidin-biotin-tornaperoxidáz komplexszel történő inkubáció (ABC, Vector 1:250) 1.5 óráig. A metszeteket kimossuk TBS-ben, majd TRIS pufferben (TB, pH=7.6) és 0.05M koncentrációjú DAB-ban (3,3'-diaminobenzidin-4HCl) előinkubáltuk 20 percig, majd a DAB kromogénhez 0.01%-os hidrogénperoxidot adva előhívtuk. Az immunpozitív sejtekben barna reakció végtermék halmozódott fel.

III./3. Kvantitatív analízis

III./3.2. Sejtszámolás

A CR- PV-tartalmú , és SPR-expresszáló sejtek területegységenkénti számának megállapításához kontroll és epilepsziás mintákból rajzoltunk ki camera lucida segítségével gyrus dentatus metszeteket a bennük levő összes sejtrel. A metszetek méretét az NIH Image programmal mértük meg, a sejtszámot 1 mm² területegységre állapítottuk meg külön a str. granulosum+moleculareban, illetve a hilusban

SPR-pozitív interneuronok dendritelágazási pontjainak meghatározása

Az SPR-pozitív sejtek dendritelágazási pontok számának változását vizsgáltuk kontroll és epilepsziás mintákban. Ehhez a CA1 régió szegmenseiből sejteket rajzoltunk ki (a teljes dendritfájukkal együtt) camera lucida segítségével mintánként 3-4 metszetből (kontroll: A rajzokon meghatároztuk az egyes sejtek dendritelágazási pontjainak a számát. Az adatokat

a Statistica 6.0 programmal értékeltük ki, Mann-Whitney U-tesztet és ANOVA-t alkalmaztunk (Toth *et al.*, 2007).

III./3.3. A szinaptikus reorganizáció vizsgálata

A PV- és CB-, CR-, CB1-R-immunpozitív terminálisok célelemeinek megoszlásához egymáshoz hasonló méretű blokkokat ágyasztunk át, majd sorozatmetszeteket készítettünk. A metszeteket szisztematikusan végignéztük és minden jelölt terminálist, amely szinaptizált, lefényképeztünk. Ezek után meghatároztuk az immunpozitív terminálisok posztszinaptikus targeteinek relatív megoszlását. A CB-immunreaktív terminálisok esetében megállapítottuk a szimmetrikus-aszimmetrikus szinapszist adó terminálisok arányát, illetve a CB-pozitív posztszinaptikus targetek arányát is. (Wittner *et al.*, 2002; Wittner *et al.*, 2005).

SPR-pozitív interneuronok szinaptikus borítottságának meghatározása

Az SPR-pozitív elemek szinaptikus borítottságának kvantifikálásához a str. orientált, pyramidale-t és radiatumot átágyasztuk a CA1 régióból kontroll és epilepsziás mintákból elektronmikroszkópos vizsgálatra. Metszetenként az összes SPR-jelölt dendritet megkerestük, és 20000-szeres nagyítás mellett lefényképeztük a dendrit profilok kerületét és a szinaptikus aktív zónák hosszát NIH ImageJ program segítségével határoztuk meg. A szinaptikus borítottságot „ μm szinapszishossz/100 μm dendritkerület” egységben adtuk meg. Az adatokat a Statistica 6.0 programmal értékeltük ki, Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk (Toth *et al.*, 2007).

IV. EREDMÉNYEK

IV./1. Immerziós fixálási eljárás reszekciós és post mortem minták esetén: új módszer kidolgozása

Az emberi agyszövetet, akár műtéti kivételből, akár post mortem kontroll agyakból származnak, immerziós fixálásnak vetik alá a leggyakrabban. Ebben az esetben a szövetblokkot fixáló oldatba merítik egy bizonyos időre, majd kiveszik belőle és metszik/kísérletbe vonják. Munkám kezdetén feltűnt, hogy rendkívül variál, ki, milyen hosszú időre, mekkora agydarabot és milyen fixálóba tesz. Sok esetben a cikkekben sem tértek ki ennek részletezésére, kivéve a fixáló oldat megadását. Én viszont azt tapasztaltam, hogy jelentős eltéréseket okoz a fixálás időtartama és a blokk mérete.

A körülmények tisztázására és standardizálására kísérletekbe kezdtem, mivel esetünkben alapvető jelentőségű volt, hogy olyan fixálási protokollt használjunk, amely reprodukálható, azonos körülmények között azonos eredményre vezet, és lehetővé teszi nem csak a minták immuncitokémiai vizsgálatát, hanem elektronmikroszkópos kvantitatív összehasonlítások elvégzését is.

Hamar kiderült, hogy a fő probléma a fixáló oldat penetrációjának elégtelensége, ami Zamboni-fixáló alkalmazása mellett a blokkok felszíni és belseje közötti sárga szín intenzitásának változásában azonnal látható volt. Kezdetben csak akkor sikerült elérni a blokkok belsejének fixálódását, ha a blokkokat legalább egy hétig fixáló oldatban hagytam, ezután viszont sokat romlott a szövet antigenecitása, ráadásul az immunfestés minősége metszetről-metszetre változott.

Ezért változtatni kezdtem a blokk méretét, a fixálás idejét, és bevezettem a blokkot tartalmazó edény rázógépre való helyezését, valamint a fixáló oldat rendszeres időközönkénti lecserélését friss oldatra. A metszeteket mind fénymikroszkópban, mind elektronmikroszkópban megvizsgáltam immuncitokémiai eljárások után, kontroll és epilepsziás betegekből származó mintákban.

Azt találtam, hogy a rázógépen való immerziós fixálás lényegesen javítja a blokkok megőrzöttségét, a penetráció megnövekszik, azonos mértékben és gyorsan befixálódik a blokkok belseje és külseje is, vigyázni kell azonban a fixálás idejére, mert így könnyű túlfixálni a blokkokat, ami már az immunreakció rovására megy. Jelentős tényező a blokkok mérete és a blokkok vastagsága is.

Azok az „ideális” körülmények, amik között én reprodukálható és immuncitokémiai vizsgálatokra fény- és elektronmikroszkópos szinten is megfelelő fixálódást kaptam, a következők:

- 4-5 mm vastag, maximum 1-1,5cm X 1-1,5 cm blokknagyság
- A kivágott blokkok lehetőség szerint azonnali fixáló oldatba helyezése
- A fixálás edénye rázógépen való mozgatása, úgy, hogy az oldat éppen ellepi a blokkot, így az mozog és folyamatosan új oldattal találkozik.
- A fixálóoldat frissre cserélése 20-30 percenként, legalább 6, de nem több mint 8 órán keresztül, szobahőn
- A fixált blokk glutármentes utófixálása 4 C fokon, rázás nélkül, egy éjszakán át
- Ezután a blokkot ki kell venni a fixálóból, és pufferben kimosni, a túlfixálás elkerülésére.

Ez a módszer lehetővé tette, hogy az egy blokkból való metszetek fixáltsága, a rajtuk végzett immunfestés, és a belőlük készült elektronmikroszkópos minta azonos minőségű legyen, és különböző agyakból származó, azonos módszerrel fixált minták is összehasonlíthatóak legyenek egymással (Magloczky *et al.*, 1997).

IV./1.1. Patkánykontroll alkalmazása a fixálás modellezésére

Hogy biztosak legyünk az eredményben, patkányon is megismételtük a fentebb vázolt fixálási módszert. Túltartattam két patkányt, majd cervicalis dislocatioval megöltem őket. Az egyiket azonnal lefejeztem, az agyat kiemeltem a koponyából, a humán hippocampusból származóhoz hasonló méretű blokkot készítettem belőle, és ugyanúgy fixáltam, ahogy az emberi hippocampus blokkokat. A másik patkány esetében vártam 2 órát, majd ugyanezt az eljárást követtem. Másnap a blokkokat lemetszettem, és

immunfestettem CB, PV és CR antitestekkel. A CB immunfestésben nem mutatkozott különbség az azonnali és a 2 óra post mortem immerziósan fixált minták között. A PV immunfestés is nagyon hasonló volt, a CA3-ban és a hilusban megfigyeltem néhány torz, gyöngyözött dendritet. A CR immunfestés is nagyon hasonló volt a sejtek számát és eloszlását tekintve, de a 2 óra post mortem késéssel fixált mintákban minden régióban lehetett látni néhány gyöngyözött dendritű sejtet, noha a sejtek túlnyomó többsége síma dendritű és normális morfológiájú volt.

Így megállapítottuk, hogy az alkalmazott immerziós fixálási eljárás rövid post mortem idejű minták esetében kielégítő, kvantitatív összehasonlító vizsgálatokat is lehetővé tevő megőrzöttséget eredményez (Wittner *et al.*, 2001a).

IV./1.2. A post mortem idő

A post mortem idő a következő kulcstényezője a kontroll agyak megőrzöttségének. A halál utáni oxigén- és energia-szegény állapotban gyorsan megindul a sejtek bomlása, mitokondriumok, membránfehérjék, a citoszkeleton, DNS szétesése. Azt tapasztaltuk, hogy bizonyos marker-tartalmú sejtek (pld. PV, SPR, CB1-R) alig érzékenyek a 8 órán belüli post mortem időben történő fixálásra, míg mások (pld. CR) különösen sérülékenyek, és 4 óránál későbbi post mortem idő esetén szignifikánsan romlik az elemek megőrzöttsége és az immunfestés minősége.

Az elektronmikroszkópos megőrzöttség minősége fordítottan aránylott a post mortem idő hosszához, mennyiségi elektronmikroszkópos elemzéseket mindig csak a legrövidebb, 2-4 órás post mortem idejű mintákon végeztünk.

A kontroll személyek életkora is befolyásolhatja az immunfestés minőségét, valószínűleg az idősebb alanyokban gyakrabban előforduló arteriosclerosis miatt, ezért azokat a betegeket, akiknél a patológiai vizsgálat arteriosclerosist talált, kizártuk, és kvantitatív analízist csak 70 évnél fiatalabb kontrollokon végeztünk.

IV./2. A hippocampális sejtpusztulás és rostsarjadzás általános jellemzésén alapuló patológiai csoportosítás

Többféle neurokémiai markerrel festettük a műtéti mintákból származó hippocampusokat annak feltárására, hogy milyen általános sejtpusztulási mintázatok fordulnak elő, és az egyes markerek által feltárt változások hogyan kombinálódnak egymással, felfedezhető-e egyfajta általános mintázat. A principáissejteket NeuN-nel és GluR2/3-mal tettük láthatóvá, a serkentő rostokat vGlut1-gyel, a gátlósejteket pedig neuropeptidek, kalciumkötő fehérjék és sejtfelszíni receptorok elleni immunfestéssel tettük láthatóvá (1. táblázat).

A betegek műtétileg eltávolított hippocampusában különböző elváltozásokat találtunk. A principális sejtek pusztulásának mértéke alapján négy típust állítottunk fel

(Wittner *et al.*, 2005). A vizsgált interneuronális változások szorosan korrelláltak a principális sejtek pusztulásával, az érzékeny idegsejtek száma, a neurokémiai változások, a morfológiai torzulások gyakorisága és az axonsarjadzás mennyisége együtt változott a principális sejtek pusztulásával. Az osztályozásnál fokozott figyelmet fordítottunk a CA1 régió piramissejtjeinek meglétére, mivel ezek képezik a hippocampus fő kimenetét a subiculum felé, és így kulcsszerepet játszanak a hippocampális-entorhinális szinaptikus kör záródásában (Wittner *et al.*, 2001a; Maglóczky, 2005; Wittner *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2007; Maglóczky, 2010; Toth *et al.*, 2010).

A patológiai típusok 2. táblázat:

1. **„Enyhe”** típus, a principális sejtek száma, eloszlása alig különbözik a kontrolltól. A gyrus dentatus szemcsesejtjei, és a CA1 régió piramissejtjeiben megfigyelhető a CB mennyisége. Az érzékeny, CR-tartalmú idegsejtek száma elsősorban a hilus területén lecsökken.

2. **„Foltos”** típus, a CA1 régió piramissejtjei foltokban pusztulnak, de az anatómiai határok és rétegek megtartottak. A CB mennyisége lecsökken a principális sejtekben, a szemcsesejtréteg esetenként megduplázódik, de szemcsesejt diszperzió nagyon ritkán figyelhető meg. Az érzékeny interneuronok morfológiai elváltozásokat mutatnak, egyesek száma csökken. A moharostok sarjadzása fénymikroszkóposan is megfigyelhető a stratum moleculareban. Az első két típust összevonva mint nem-szklerotikus eseteket is említjük a változások leírása folyamán.

3. **„Szklerotikus”** típus, a CA1 régió piramissejtjeinek több, mint 90%-a hiányzik, a szemcsesejtréteg majdnem minden esetben diszpergált, szétvándorolt, CB tartalmuk részben vagy egészen hiányzik, szembeötlő a mohasejtek és CA3c piramissejtek részleges pusztulása, az érzékeny gátlósejtek drámai számcsökkenése. A rostsarjadzás feltűnő, különösen a gyrus dentatusban, de a szklerotikus CA1 régió fő tömegét is axonterminálisok alkotják a gliális elemek mellett.

4. **„Gliotikus”** típus, amelyben a szklerotikus mintákban megfigyelt érzékeny sejtek mellett a „rezisztens”, más betegek hippocampusában túlélő idegsejtek is nagy számban pusztulnak, úm. a szemcsesejtek vagy a CB-tartalmú interneuronok. Ritkán fordult elő.

2. Táblázat. A 18 évnél idősebb TLE betegek megoszlása a különböző patológiai csoportokban

A patológiai csoportosítást a principális sejtek számának csökkenése, a serkentő pályák sarjadzása és egyes interneuron típusok számának csökkenése alapján alakítottuk ki. **1.**

„Enyhe” típus, a principális sejtek száma, eloszlása alig különbözik a kontrolltól. **2.**

„Foltos” típus, a CA1 régió piramissejtjei foltokban pusztulnak, de az anatómiai határok és rétegek megtartottak. **3. „Szklerotikus”** vagy sarjadzó típus, a CA1 régió piramissejtjeinek több, mint 90%-a hiányzik, a szemcsesejtréteg majdnem minden esetben diszpergált. A rostsarjadzás feltűnő.

4. „Gliotikus” típus, amelyben a scleroticus mintákban megfigyelt érzékeny sejtek mellett a „rezisztens”, más betegek hippocampusában túlélő idegsejtek is nagy számban pusztulnak, úm. a szemcsesejtek vagy a calbindin-tartalmú interneuronok (Magloczky, 2010).

A TLE betegek csoportosítás a sejtpusztulás és rostersajdzás alapján	Százalékos gyakoriság az összes betegre vonatkoztatva (N=104)	Átlagos életkor (év) _____ _____ Minimum/maximum életkor a csoporton belül(év)	Az epilepsziabetegség fennállásának átlagos hossza (év) _____ Minimum/maximum fennállási hossz a csoporton belül (év)
1. Típus ENYHE	18,3% N=19	34,2 _____ _____ 18/56	14,3 _____ _____ 0,5/39
2. Típus FOLTOS	25% N=26	35,9 _____ _____ 18/63	19,4 _____ _____ 0,2/40
3. Típus SZKLERO- TIKUS	49% N=51	38,2 _____ _____ 20/68	18,55 _____ _____ 0,2/48
4. Típus GLIOTIKUS	7,7% N=8	35,6 _____ _____ 18/52	14,4 _____ _____ 2/37

Megfigyelhető, hogy a legtöbb beteg szklerotikus volt, a legkevesebb beteget a gliotikus csoportban találhatjuk. Feltűnő az is, hogy a betegek átlagos életkora illetve az epilepszia betegség fennállásának átlagos hossza nem korrelál a sejtpusztulás súlyosságával, noha a minimum/maximum fennállási időtartam is nagyon hasonló a csoportok között.

IV./3. A funkcionálisan különböző gátlósejttípusok és kapcsolataik átalakulása temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő betegek műtétilag eltávolított hippocampusában: a gyrus denatus interneuronjai

Jelen dolgozatban a kontroll, illetve a sebészileg eltávolított epilepsziás hippocampus két régióját vizsgáltuk meg: a gyrus dentatust, mely szerepet játszik az epileptogenezisben, de jelentős mértékű principálisajt pusztulás nincsen benne, valamint a CA1 régiót, ahol viszont a legnagyobb tömegű a principálisajt pusztulás hippocampális szklerózisban, és amely a hippocampus legjelentősebb kimenetét adja a subiculum felé. Vizsgálataink egyik legfontosabb szempontja volt, hogy nem csak a szklerotikus betegek hippocampusát analizáltuk, hanem azokat is, amelyekben a piramisajtek többnyire megőrződtek, az enyhe és foltos típust is, így lehetőségünk van összehasonlítani a különböző mértékű principálisajt pusztuláshoz köthető gátlósejt változásokat.

Ezekben a régiókban a PV- és CCK-tartalmú periszomatikus gátlósejtek, a CB- és SPR-tartalmú dendritikus gátlósejtek, valamint a CR-tartalmú, dendritikus és interneuron-szelektív gátlásban résztvevő neuronok eloszlását, számát, morfológiai jellemzőit, valamint ki- és bemeneti tulajdonságait vizsgáltuk meg.

IV./4. A talált epilepsziás reorganizáció jelenségei

Principális sejtek: A hippocampus gyrus dentatusának szemcsesejtjei, valamint a CA3 a,b régió és a CA2 mező piramisajtjei nagymértékben megőrződnek epilepsziás mintákban. Ezeket rezisztens régióknak is nevezik (Margerison & Corsellis, 1966b). Ez nem azt jelenti, hogy itt a sejtek száma nem csökken, mert a CA3-CA2-ben is leírtak bizonyos mértékű sejtszám csökkenést (Babb *et al.*, 1984), de itt nem fordul elő tömeges sejtpusztulás, illetve a régió sejtjeinek teljes eltűnése, mint a scleroticus CA1-ben. A rezisztens sejtek sem maradnak változatlanok. Kontroll hippocampusban a gyrus dentatus szemcsesejtjeiben calbindin kalciumkötő fehérje van (Sloviter *et al.*, 1991), mely a sejttestekben, dendritekben, és axonjaikban, a mohaterminálisokban is kimutatható. Epilepsziás hippocampusokban a calbindin mennyisége erősen lecsökken a szemcsesejttestekben, egyes sejttestből teljesen eltűnik, és a mohaterminálisok egy része is negatív lesz (Magloczky *et al.*, 1997; Nagerl *et al.*, 2000). Ez a neurokémiai változás megfigyelhető az életbenmaradó – nem sklerotikus esetekben – CA1 piramisokban is, melyek kontrollban szintén tartalmaznak calbindint, míg epilepsziás esetekben részben vagy egészben eltűnik belőlük ez a kalciumkötő fehérje (Wittner *et al.*, 2002). Humán epilepsziás szelet preparátumban történt mérések szerint serkentés hatására kevesebb kalcium lép be azokba a szemcsesejttestbe, melyek nem tartalmaznak calbindint, így a kalciumkötő fehérje mennyiségének csökkenése citoprotektív hatású lehet (Nagerl *et al.*, 2000).

Gátlósejtek: Az életben maradó interneuronok többsége morfológiai változáson esik át epilepsziás szövetben. A legkevésbé érzékeny, dendritikus, és a CA1 régióban részben periszomatikus gátlásban résztvevő calbindin-tartalmú interneuronok (Sloviter *et al.*, 1991; Seress *et al.*, 1993) sejttestének mérete megnövekszik (Magloczky *et al.*, 2000), nem csak a gyrus dentatusban, de a scleroticus CA1 régióban is (Wittner *et al.*, 2002). A kontrollban síma dendritek gyakran tüskések lesznek, sőt a sejttesteken is megfigyelhetünk tüskéket (Magloczky *et al.*, 2000).

A sejtek és dendritek egy részét glianyúlványok borítják, csökkentve ezáltal a szinaptikus felvevő felületet. Ez azt sugallja, hogy a gliasejtek aktív szerepet játszanak a sejtek szinaptikus bementének, és annak mértékének szabályozásában. A szabad felszíneken megnő a szinaptikus borítottság (Maglóczy *et al.*, 2000). A periszomatikus gátlásban résztvevő parvalbumin-tartalmú gátlósejtek száma erősen lecsökken a sclerotikus betegek gyrus dentatusában (Zhu *et al.*, 1997; Wittner *et al.*, 2001a). Axonjaik azonban nem tűnnek el, sűrű axonfonadék figyelhető meg a principális sejtek körül azokon a területeken is, ahol alig található 1-1 parvalbumin-tartalmú sejt (Wittner *et al.*, 2001a). A nem-sclerotikus betegekben is megfigyelhető mérsékelt sejszámcsökkenés, az axonok itt is sűrű kötegeket alkotnak. A jelenséget a parvalbumin-immunreakció csökkenése magyarázza. Epilepszia- és ischemia modellekben leírták, hogy a túlserkentés hatására létrejövő kalcium-túltöltődés hatására a parvalbumin olyan konformációt vesz fel, melyet az antitest nem ismer fel, így nem kimutatható a sejtekben és dendritekben, sokszor az axonokban sem, de az axonfonadék általában immunpozitív marad (Johansen *et al.*, 1990; Maglóczy & Freund, 1993; Scotti *et al.*, 1997). Az epilepsziás mintákban a parvalbumin-tartalmú gátlósejtek erős serkentő beidegzést kapnak, ezért feltételezzük, hogy hasonló jelenség játszódik le az epilepsziás betegekben is. A parvalbumin-tartalmú gátlósejtek mindaddig jelen vannak, amíg axonjaik megtalálhatók a régióban, csak magukat a sejteket és dendriteket nem lehet immunreakcióval láthatóvá tenni. Az axonok csak a scleroticus CA1 régióból hiányoznak teljesen, ahol a gátlósejtek célelemei, a piramissejtek már nincsenek jelen, és itt maguk a parvalbumin-tartalmú gátlósejtek is meghalnak (Wittner *et al.*, 2005), míg a gyrus dentatusban egy részük megőrződik, csak a parvalbumin nem mutatható ki bennük (Wittner *et al.*, 2001b).

A P anyag (substance P) receptorát kifejező sejtek speciális gátlósejttípust képeznek a humán hippocampusban. A receptor csak a sejteken és dendriteken van jelen, az axonokon nem, így funkciójukról csak közvetett vizsgálatokkal nyerhettünk információt. Kolokalizációs vizsgálatok szerint a sejtek részben a dendritikus régiót beidegző sejtek csoportjába tartoznak. Epilepszia hatására jelentős dendritszám növekedést mutatnak, valamint a dendritek gyöngyöztékké válnak, és sokkal több rajtuk az elágazódás, mint a kontroll hasonló sejtjein (Maglóczy *et al.*, 2000).

SEJTVÁNDORLÁS

Epilepsziás mintákban megfigyelték, hogy egyes sejtípusok elhelyezkedése megváltozik. A szemcsejtek diszperzióját nagyszámú epilepsziás betegben leírták (Houser, 1990). A jelenség a scleroticus hippocampusokban gyakori, a nem-scleroticus betegekben ritkán fordul elő. Megfigyeltük egy interneuron típus, a P anyag receptorát expresszáló gátlósejtek abnormális lokalizációját is a gyrus dentatusban. Ezek a sejtek kontrollban a hilusban található legnagyobb számban, míg epilepsziás mintákban a stratum moleculáreban voltak a leggyakoribbak (Maglóczy *et al.*, 2000). A scleroticus esetekben több abnormális elhelyezkedésű idegsejt volt, mint a nem-scleroticus esetekben.

AXONSARJADZÁS

Külső pálya axonsarjadzása: A hippocampus calretinin-tartalmú serkentő bemenetet kap a supramammillaris nucleustól (Borhegyi & Lanth, 1997). Az axonok sűrű hálózatot képeznek a gyrus dentatusban a szemcsesejt réteg tetején, valamint a CA3 a,b és CA2 régióban (Magloczky *et al.*, 2000). A pálya glutamát mellett P anyagot tartalmaz, és növeli sejtek serkentetőségét (Liu *et al.*, 2000). Epilepsziás betegek gyrus dentatusában a pálya kiterjed, és elfoglalja az egész stratum moleculare, főleg a szemcsesejteken végződik, és növelheti a szemcsesejtek aktiválhatóságának valószínűségét. Megfigyelték a subiculumból a hippocampus CA1 régiójába vetítő rostok megjelenését is epilepsziás állatokban (Lehmann *et al.*, 2000).

Gátlósejtek axonsarjadzása:

Korábbi munkákban nem csak a GABA-tartalmú neuronok megőrződését (Babb *et al.*, 1989), de a GABA_A axonterminálisok sarjadzását is leírták epilepsziás hippocampusban (Babb, 1999). Megfigyelték ezen kívül a somatostatin- és neuropeptid Y-tartalmú axonok sarjadzását is a gyrus dentatusban (de Lanerolle *et al.*, 1989; Mathern *et al.*, 1995). Megvizsgálva a calbindin- és parvalbumin-tartalmú sejtek axonjait, azt találtuk, hogy ezek a gátlósejtek is sarjadzanak. A parvalbumin-immunreaktív axonok nagyobb arányban idegzik be a szemcsesejtek axon iniciális szegmentumát epilepsziás gyrus dentatusban, mint kontrollban (Wittner *et al.*, 2001a). A CCK-tartalmú periszomatikus sejtek axonján CB1-R expresszálódik, rostjaikat CB1-R-immunfestéssel vizsgáltuk a gyrus dentatusban. Azt találtuk, hogy epilepsziás betegekben, különösen a szklerotikusokban, megnő a rostok denzitása, melyet kvantitatív vizsgálattal is igazoltunk. A rostok sarjadzanak, de azt nem tudtuk eldönteni ebben a kísérletben, hogy a terminálisok csak többen lesznek-e, vagy a receptorok is nagyobb számban fordulnak elő az egyes terminálisokban. A CA1 régió piramisait is megvizsgáltuk nem-szklerotikus esetekben, és itt a gátló bemenet megőrződött ugyan, de nem nőtt meg a beidegző kosár- és axo-axonikus rostok mennyisége (Wittner *et al.*, 2005). Így megállapítottuk, hogy az axo-axonikus sejtek epilepszia hatására sarjadzanak gyrus dentatusban. A principális sejtek dendritikus gátlásában résztvevő calbindin-tartalmú interneuronok szintén sarjadzást mutattak epilepsziás hippocampus CA1 régiójában, mind a scleroticus, mind a nem-scleroticus esetekben, és nagyobb arányban végződtek a többi gátlósejten, mint kontrollban (Wittner *et al.*, 2002). Így epilepsziás mintákban a gátlósejtek gátlásával diszinhibíció jöhet létre. A calbindin-tartalmú gátlósejtek epilepsziás mintákban nem csak megőrződnek, de eredeti célsejtjeik, a CA1 piramisok pusztulása után képesek targetváltásra is, és új célelmet választva, az életben maradó gátlósejteken végződnek (Wittner *et al.*, 2002)

Az interneuron-szelektív sejtek pusztulása és dendritikus hálózatuk összeomlása

A CR-tartalmú sejtek funkcionálisan heterogének a humán hippocampusban, interneuronokon is, és piramisait dentritiken is végződnek. Számuk erőteljesen lecsökken szklerotikus és nem-

szklerotikus betegek hippocampusában, dendritjeik felszegmentálódnak, és ezért működésképtelenné válik a dendritjeiken keresztül megvalósuló elektromos kapcsolat. Kontrollban ezek a sejtek intenzíven végződnek CB-pozitív dendritikus gátlósejteken, és szinkronizálják a gátlósejtek működését. Azonban epilepsziás betegekben ezt a szinkronizációt nem tudják megvalósítani, így a dendritikus gátlás kevésbé működik.

V. MEGBESZÉLÉS

V. 1. Az funkcionálisan különböző interneuronok érzékenysége és megőrződése a humán epilepsziás hippocampusban

Ha összegezzük az eredményeket, kitűnik, hogy jelentős különbség van a gyrus dentatus és a CA1 régió interneuronjainak megőrződésében, ugyanakkor vannak bizonyos interneuronok, melyek mindkét régióban megmaradnak, pld. a CB-tartalmú (Magloczky *et al.*, 2000) (Wittner *et al.*, 2002) és CCK-tartalmú sejtek (Magloczky *et al.*, 2010). A PV-tartalmú és SPR-kifejező sejtek csak a szklerotikus CA1 régióban pusztulnak el (Wittner *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2007), a CR-tartalmú sejtek viszont minden régióban érzékenyek, a nem-szklerotikus és a szklerotikus hippocampusban is (Toth *et al.*, 2010). Tehát önmagában a CA1 régió megőrzöttsége vagy pusztulása alapján nem tudjuk megjósolni a gátlósejtek érzékenységét, noha a szklerotikus hippocampusban a gyrus dentatus változásai is markánsabbak (Magloczky *et al.*, 2000; Wittner *et al.*, 2001a).

V.2. Periszomatikus gátlás

Részletesen elemezve, azt találjuk, hogy a periszomatikus, PV- és CCK-tartalmú gátlósejtek jól megtartottak, a nem-szklerotikus hippocampusban eloszlásuk és morfológiájuk alig különbözik a kontrolltól (Wittner *et al.*, 2001a; Wittner *et al.*, 2005; Magloczky *et al.*, 2010).

A szklerotikus gyrus dentatusban azonban a PV-immunfestés nem mutatható ki a sejtekben és a dendritekben, a sejtszám lecsökken, noha a terminálisok jelentős részében megmarad (Wittner *et al.*, 2001a). Hasonló jelenséget írtak már le epilepsziás betegek agykérgében is, ahol elektronmikroszkópos vizsgálatot nem végeztek, és ezért úgy gondolták, a PV-immunpozitív sejtek eltűnése a pusztulásukat jelenti és ez az oka az epilepsziának (DeFelipe *et al.*, 1993; Marco *et al.*, 1997; DeFelipe, 1999). Valamint modellekben is leírták a PV-immunreakció gyengülését, epilepsziában (Magloczky & Freund, 1995) és isémiában is (Kamphuis *et al.*, 1989; Johansen *et al.*, 1990; Best *et al.*, 1993). Azonban a modellekben jól látszik, hogy a sejtek maguk nem tűnnek el, pld. az általunk használt káinsavas modellben 1 nappal a káinsav-által kiváltott rohamok után alig lehetett PV-tartalmú sejtet látni a hippocampusban, a 3 nap túlélésű állatokban viszont újra ki lehetett mutatni a PV-tartalmú sejteket immunreakcióval (Magloczky & Freund, 1995). A jelenséget azzal hozzák összefüggésbe, hogy jelentős kalcium-beáramlás hatására – mint amilyen pld. epilepsziás

roham hatására létrejön – a PV túltöltődik kalciummal, és konformáció változáson esik át, ezért nem ismeri fel az antitest (Johansen *et al.*, 1990). Az epilepsziás gyrus dentatusban a sejtek eltűnése mellett az axonok jelentős részének megőrződését, a sejtestek gátló bemenetének megmaradását, és a gátló bemenet megnövekedését találtuk szemcsesejtek axon iniciális szegmentumán, tehát a PV-tartalmú sejtek egy része megőrződik (Wittner *et al.*, 2001a) csak nem lehet PV-immunfestéssel kimutatni.

A CA1 régióban azonban nem járnak ilyen jól a PV-tartalmú sejtek. A nem-szklerotikus régióban ugyan megőrződik a piramisok sejtestének bemenete, csak a foltos típusban csökken kis mértékben, de axonsarjadzás az iniciális szegmentumon nincs, és a szklerotikus CA1 régióból teljesen eltűnnek a PV-immunfestett elemek, se sejt, se dendrit, se terminális (Wittner *et al.*, 2005). Pedig a terminálisok jelentős része megőrzi PV-immunreaktivitását mind epilepsziás állatban (Magloczky & Freund, 1995), mind epilepsziás betegek gyrus dentatusában (Wittner *et al.*, 2001a), hiányuk tehát a sejtek pusztulását jelzi. Mivel eredeti posztszinaptikus célelemük a piramis sejtek voltak, és a szklerotikus CA1-ben ezek sincsenek jelen többé, megállapíthatjuk, hogy célelemeik pusztulásával a PV-tartalmú sejtek maguk is eltűnnek (Wittner *et al.*, 2005).

A CCK-tartalmú periszomatikus gátlósejtek mind a nem-szklerotikus, mind szklerotikus hippocampusban jelen vannak, jól megtartottak, dendritmorfológiájuk is csak annyiban változik, hogy a zsugorodott CA1 régióban horizontális dendritű sejteket látunk. A szklerotikus betegek gyrus dentatusában a CCK-tartalmú sejtek axonsarjadzását találtuk, melyet CB1-R elleni immunfestéssel tettünk láthatóvá. A CB1-R-immunfestett terminálisok megtartották eredeti végződési mintázatukat, de sokkal intenzívebb immunreakciót mutattak (Magloczky *et al.*, 2010).

A denzitometriai eredmények azonban nem adtak választ arra, hogy az erősebb immunfestést az egyes terminálisokban előforduló több receptor, vagy nagyobb mennyiségű, sarjadzó terminális okozza-e. A fénymikroszkópos képeken több rost látszott, de nem lehetett kizárni a receptorok mennyiségének megemelkedését sem. Végül erre a kérdésre a pilocarpine-indukálta epilepszia modellünkben kaptuk meg a választ, a szklerotikus állatok gyrus dentatusában megnőtt a terminálisok száma, és az egyes terminálisokban is több lett a receptor (Karlocai *et al.*, 2011). Az eredmények arra utalnak, hogy a CCK-tartalmú periszomatikus gátlósejtek is sarjadzanak epilepsziában.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a periszomatikus gátlósejtek sarjadzása miatt a gyrus dentatusban a szemcsesejteken több a gátló bemenet, mint a kontrollban. Az axon iniciális szegmentumon a PV-tartalmú bemenet már a nem szklerotikus betegekben is megerősödik (Wittner *et al.*, 2001a), a szklerotikus betegekben pedig a kontroll többszöröse lesz, így a szemcsesejtek szinkronizációja sokkal valószínűbb esemény egy epilepsziás betegben, mint kontrollban. Annál is inkább, mert a mohaterminálisok sarjadzását is megfigyelték epilepsziás betegekben (Houser *et al.*, 1990; Babb *et al.*, 1991; Franck *et al.*, 1995), mi is találtuk ezt saját mintáinkban, szklerózistól függetlenül, így a szemcsesejtek dendritjei egy megerősödött serkentő bemenetet kapnak, nem csak kevés és ritka bazális

denritjeikre a hilusban, hanem kiterjedt, str. moleculareban elhelyezkedő dendritfákra is, így az aktivitást közvetlenül át tudják adni egymásnak. Elképzelhető, hogy a gátló terminálisok nagyobb száma a szemcsesejteken egy kompenzációs jelenség, melyet éppen a megnövekedett serkentő bemenet váltott ki.

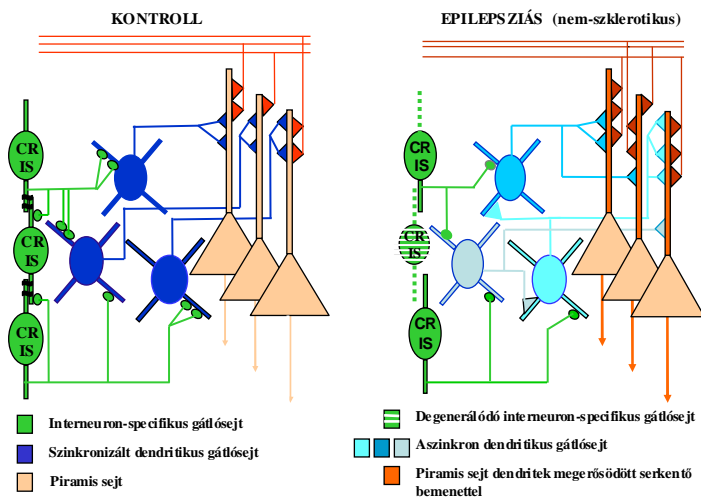
V. 3. Dendritikus és interneuron szelektív gátlósejtek

A CB-immunpozitív sejtek rezisztenciája már ismert volt állatkísérletes modellben (Sloviter, 1989; Houser, 1991; Freund *et al.*, 1992; Magloczky & Freund, 1993) és emberi epilepsziás szövetben is (Sloviter *et al.*, 1991; Suckling *et al.*, 2000). A CB-tartalmú sejtek száma valóban nem változott jelentősen az általunk vizsgált epilepsziás szövetben sem, különösen a nem-szklerotikus esetekben (Magloczky *et al.*, 2000; Wittner *et al.*, 2002). De a szklerotikus CA1-ben és gyrus dentatusban rendkívüli morfológiai változáson estek át. Megnőttek a sejttestek, meghosszabbodtak a dendritek, tüskék képződtek a dendriteken és sejttesteken, amik szinapszisokat kaptak. A sejtek épek voltak még a szklerotikus hippocampusban is, és rendkívül aktív anyagcsere jeleit mutatták (Magloczky *et al.*, 2000; Wittner *et al.*, 2002). Nem pusztultak el annak ellenére sem, hogy a szklerotikus CA1 régióban elvesztették eredeti targetjeiket, a piramisetteket. Axonjaik új posztszinaptikus célelemeket találtak maguknak, és nagyobb arányban végződtek interneuronokon, mint kontrollban (Wittner *et al.*, 2002).

Különösen fontos, hogy ez a targetváltás nem korlátozódott kizárólag a szklerotikus CA1-re, hanem már a nem szklerotikus betegekben is megfigyelhető volt, tehát a CB-tartalmú interneuronok az epilepsziás esetekben a principáissejtek pusztulásától függetlenül nagyobb arányban végződnek CB-pozitív dendriteken, mint kontrollban. Ennek legvalószínűbb oka, hogy az epilepsziás hippocampusban a CR-tartalmú sejtek száma erősen lecsökken (Toth *et al.*, 2010), dendrithálózatuk pedig, melyeken keresztül össze vannak kapcsolva, éppúgy, mint a PV-tartalmú sejtek, szétesik és felszegmentálódik (Wittner *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2010). Ugyanis kimutattuk, hogy a CR-tartalmú interneuronok sok végződést adnak CB-immunfestett interneuronok dendritjeire (Toth *et al.*, 2010), feltehetően azért, hogy a patkányban megfigyeltékhez hasonlóan (Gulyas *et al.*, 1996) az emberi hippocampusban a CR-immunpozitív interneuron-szelektív sejtek képesek legyenek összehangolni a dendritikus gátlósejtek – melyek jelentős része CB-tartalmú – működését. De, ha a CR-tartalmú sejtek száma lecsökken, és dendritjeik károsodnak, képtelenek erre, és a CB-immunreaktív sejtek működése sem lesz hatékony. Elképzelhető, hogy a CB-tartalmú sejtek azért végződnek nagyobb arányban egymáson, hogy pótolni tudják a kieső CR-tartalmú terminálisokat, és kompenzációként szinaptizálnak többet interneuronokon. Azonban kétséges, hogy egy ilyen neuronhálózat „véletlenszerűen” összekapcsolódó gátlósejtekkel képes lehet-e egy olyan, szinte tökéletesen hangolt szinkron működés létrehozására, mint a kontrollban.

2. Ábra. Összefoglaló sematikus diagram a CR-pozitív interneuronokat és dendritikus gátlósejteket hálózatának zínaptikus reorganizációjáról a nem-szklerotikus epilepsziás CA1 régióban. Kontroll: a humán hippocampusban a CR-tartalmú sejtek egy része interneuron-szelektív gátlósejt, melyek dendritikus gátlósejteken (sötétkék) és más CR-immunpozitív interneuronokon (zöld) végződnek. Az elektromos szinapszisokkal összekapcsolt CR-tartalmú sejtek hatékonyan szinkronizálják a dendritikus gátlósejt bemenetének hatását a piramissejt dendriteken (narancssárga). Epilepsziás, nem-szklerotikus: a CR-tartalmú sejtek egy része degenerálódik, és sérül a dendritjeik közti elektromos kapcsolat. Ez felborítja a dendritikus gátlósejt szinkronizációját (különböző világoskék árnyalatok), ami egy kevésbé hatékony dendritikus gátlást eredményez a piramissejt dendriteken, és így felerősödhet a serkentő bemenetek hatása (sötétnarancs) amik egyébként is többen vannak, a serkentő pályák sarjadzása miatt epilepsziában.

2. Ábra. Összefoglaló sematikus diagram a CR-pozitív interneuronokat és dendritikus gátlósejteket hálózatának zínaptikus reorganizációjáról a nem-szklerotikus epilepsziás CA1 régióban. Kontroll: a humán hippocampusban a CR-tartalmú sejtek egy része interneuron-szelektív gátlósejt, melyek dendritikus gátlósejteken (sötétkék) és más CR-immunpozitív interneuronokon (zöld) végződnek. Az elektromos szinapszisokkal összekapcsolt CR-tartalmú sejtek hatékonyan szinkronizálják a dendritikus gátlósejt bemenetének hatását a piramissejt dendriteken (narancssárga). Epilepsziás, nem-szklerotikus: a CR-tartalmú sejtek egy része degenerálódik, és sérül a dendritjeik közti elektromos kapcsolat. Ez felborítja a dendritikus gátlósejt szinkronizációját (különböző világoskék árnyalatok), ami egy kevésbé hatékony dendritikus gátlást eredményez a piramissejt dendriteken, és így felerősödhet a serkentő bemenetek hatása (sötétnarancs) amik egyébként is többen vannak, a serkentő pályák sarjadzása miatt epilepsziában.



V.4. A gátlósejtek szinaptikus reorganizációjának hálózati hatása epilepsziában

A hálózati összhatás tehát a periszomatikus gátlás megerősödése, különösen a gyrus dentatusban (Wittner *et al.*, 2001a), miközben a dendritikus gátlás meggyengül, elsősorban nem is a dendritikus gátlósejtek pusztulása, hanem a CR-tartalmú sejtek dendritikus hálózatának és degenerálódásának eredményeképpen (Toth *et al.*, 2010). A dendritikus gátlósejtekből viszonylag sok életben marad epilepsziás hipocampusban. A CB-tartalmú sejtek megőrződnek, mind állatkísérletes modellben (Sloviter, 1989; Houser, 1991; Freund *et al.*, 1992; Maglóczy & Freund, 1993), mind emberben (Sloviter *et al.*, 1991; Maglóczy *et al.*, 2000; Suckling *et al.*, 2000; Wittner *et al.*, 2002), a SOM- és NPY-tartalmú sejtek ugyan részben elpusztulnak (de Lanerolle *et al.*, 1988; Sundstrom *et al.*, 2001), de valamilyen mennyiségük mindig megmarad (Sundstrom *et al.*, 2001), és kompenzációs sarjadzással (de Lanerolle *et al.*, 1988) igyekszik pótolni a kieséseket. De a dendritikus gátlás sokkal kevésbé hatékony, mint a periszomatikus, és több sejt együttműködését igényli (Miles *et al.*, 1996), így a CR-tartalmú sejtek szinkronizáló hatása és ép hálózata nélkül nincs esély hatékony dendritikus gátlásra. Ki is mutatták állatkísérletes modellekben, hogy nem a gátlás általános gyengülése áll az epilepszia patomechanizmusának hátterében, hanem a dendritikus gátlás gyengül meg (Cossart *et al.*, 2001), ráadásul több serkentő pálya sarjadzik, moharostok (Sutula *et al.*, 1989), supramammiláris pálya (Maglóczy *et al.*, 2000) és a septális és entorhinális bemenet (Lehmann *et al.*, 2001), amit a meggyengült dendritikus gátlás már nem tud szabályozni. Így a periszomatikus gátlás szinte átveszi az irányítást, és növeli a principális sejtek szinkron tüzelésének valószínűségét.

.....és ha a GABA serkentő?

Több eredmény is alátámasztja azt, hogy a GABA bizonyos sejtekben, bizonyos körülmények között nem hiperpolarizáló hanem depolarizáló hatású, többen is megfigyelték ezt a jelenséget epilepsziás szeletben {Cohen, 2002 #2873;Haug, 2003 #4254;Khalilov, 2003 #4255}.

Meglepő talán, de a hálózati összehatáson keveset változtatna az, ha a GABA nem hiperpolarizáló, hanem depolarizáló hatású lenne. A dendritekre és sejttesteke érkező "kosársejt serkentés" ugyan nem fogja ugyanolyan hatásfokkal növelni a szinkronitást, mint a gátlás, de az axon iniciális szegmentumok serkentése ugyanúgy fokozhatja a principálissejtek tüzelési készségét, mint a gátlás (Szabadics *et al.*, 2006). A dendritikus sejtek csak akkor hatékonyak, ha több együtt, egyszerre működik (Miles *et al.*, 1996), ha a GABA serkentő, ez még inkább így van. Az interneuron-szelektív sejtek pedig akkor sem képesek őket szinkron működésre bírni, ha serkentenek. Tehát a dendritikus sejtek szinkronizációja ebből a hálózathoz is hiányozni fog.

Mindazonáltal, a megnövekedett serkentés a serkentő axonpályákkal együtt növelheti a principálissejtek tüzelési valószínűségét, mivel a PV- és CCK-tartalmú periszomatikus (Wittner *et al.*, 2001a; Magloczky, 2010; Magloczky *et al.*, 2010), és a CB-tartalmú dendritikus sejtek is sarjadjanak (Wittner *et al.*, 2002).

Azt is figyelembe kell venni, hogy a GABA depolarizáló hatását nem homogénen az egész hippocampusban mérték, hanem egy-egy sejten, vagy egyes sejtek szűk környezetében (Cohen *et al.*, 2002; Huberfeld *et al.*, 2007). Az ilyen foltok kialakulása valószínűleg az epilepsziás rohamok által megnövelt magas kálium szint következménye (Fisher *et al.*, 1976), amely szintén nem egyöntetűen mindenhol, hanem sporadikusan, bizonyos területeken alakul ki. Itt a kálium-klorid kotranszporter működése megváltozik, és a sejt belseje irányában haladnak rajta keresztül a klorid ionok, ezért a GABA-A receptorban lévő klorid csatornán már csak kifelé tudnak menni, és a GABA depolarizálni fog {Katchman, 1994 #4256;Van Den Pol, 1996 #3564;Vale, 2000 #4257;Rivera, 2002 #3510}. Ez a depolarizáló hatás azonban időben és térben heterogén lesz, és nem egyöntetű, így még az epilepsziás hippocampusban is lehet a GABA hálózati összehatása gátló, attól függően, mennyi és mekkora ilyen folt van.

V.5. Növekedési és jelenségek az epilepsziás hippocampusban

A gátlósejtek axonsarjadjásán kívül még számos serkentőpálya is sarjadjik, melyek már régebben is ismertek voltak, mint a moharostok sarjadjás (Sutula *et al.*, 1989) vagy aseptális és entorhinális bemenet sarjadjása (Lehmann *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2006). Mi pedig a supramammilláris pálya kiterjedését találtuk epilepsziás esetekben, mind nem-szklerotikus, mind szklerotikus betegekben (Magloczky *et al.*, 2000). Ráadásul a szinaptikus terminálisok mérete, a szinaptikus aktív zónák hossza megnő, és gyakoribbá válnak a zonula adherentiák olyan interneurontípusok dendritjei között is, melyek ezt a tulajdonságot nem

mutatták kontrollban (Wittner *et al.*, 2002; Wittner *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2007). Leírták a gap junction-ok mennyiségének növekedését epilepsziás patkányban (Szente *et al.*, 2002), és valószínű, hogy epilepsziás emberi hippocampusban is ez a jelenség áll a gyakoribb dendritikus kapcsolatok megjelenésének hátterében.

A sejtek növekedését, dendritsarjadzást és axonsarjadzást valószínűleg a hippocampus egyes sejtjeiben termelődő, és epilepsziában megnövekedő mennyiségű neurotrofinok okozzák. Neurotrofinokat (NT3, NT5) termelnek a szemcsesejtek (Mathern *et al.*, 1997; Jankowsky & Patterson, 2001), és ennek megemelkedett szintje okozza valószínűleg a moharostok sarjadzását (Mathern *et al.*, 1997). De idegnövekedési faktort (NGF) találtak a supramammilláris pályában is, mely szintén hathat a mohaterminálisok sarjadzására (Lee *et al.*, 1997; Hughes *et al.*, 1999). Az is feltűnő, hogy a supramammillaris pálya végződési területe: gyrus dentatus, CA3 a,b, CA2, megegyezik azokkal a területekkel, melyekben legjobban megőrződnek a principális sejtek epilepsziás szövetben (Magloczky *et al.*, 1994; Borhegyi & Lanth, 1997). Valamint a pálya által ellátott gyrus dentatusban az SPR-expresszáló sejtek nem csak dendritikus sarjadzást mutatnak, hanem a kontrolltól eltérő elhelyezkedést is, mintha felvándoroltak volna a str. molecularéba, ahol a supramammilláris pálya rostjai szétterjedtek (Magloczky *et al.*, 2000). Az is lehetséges persze, hogy ez nem ugyanaz a sejtpopuláció, mint kontrollban, hanem más sejtek expresszálják az SPR-t. De a hilusból viszont eltűnnek ugyanazok a morfológiailag hasonló, csak több dendrittel rendelkező sejtek, ezért a felvándorlást mi valószínűbbnek tartjuk (Magloczky *et al.*, 2000). Lehetséges, hogy a magas SP-tartalmú supramammillaris pálya megerősödése és térfoglalása áll a jelenségek hátterében.

A CA1-ben viszont, ahol nincs supramammillaris végződés, valószínűleg a principális sejtek által epilepsziás rohamok hatására termelődő SP (Liu *et al.*, 1999) lehet felelős a morfológiai változásokért és dendritsarjadzásért. Kimutatták, hogy az SP nem csak fokozza a sejtek aktivitását, de dendritjeiket is gyöngyözté teszi (Mantyh *et al.*, 1995), így a felgyöngyözött dendritfa az SPR-expresszáló sejteken a nagyobb aktivitás jele lehet (Liu *et al.*, 1999). Talán a CA1 piramisok SP termelése egy kompenzációs jelenség lehet epilepsziában, hogy így fokozzák a részben bizonyosan dendritikus gátló SPR-expresszáló sejtek működését.

V. 6. Szklerózis, sejtpusztulás, és sarjadzás

Az epilepszia hatására túlserkentett sejtszoptok pusztulásának két fő mechanizmusa ismert az excitotoxicitási hipotézis szerint (Olney, 1990; Meldrum, 1991; Choi, 1992). Az első egy akut ödéma, melyet a serkentő aminosavak által kinyitott ioncsatornákon keresztül az idegsejtbe jutó abnormális mennyiségű ionok és víz okoznak. Ez nem szelektív, minden sejtet érint melyek excitotoxin hatásának lettek kitéve (Olney, 1990; Meldrum, 1991) a sejtek jelentős része azonban képes ezt a nagy mennyiségű iont és vizet kipumpálni magából és túlélni az ödémás károsodást. Az érzékeny interneuronok, melyek epilepszia modellekben a rohamindukciót követően néhány órával eltűnnek, valószínűleg az akut ödémás mechanizmussal halnak meg. A második mechanizmus egy késleltetett, kalcium által közvetített folyamat (Olney, 1978; Choi, 1992), ahol

feszültségfüggő NMDA-típusú glutamát receptorok által megnyitott csatornákon keresztül kalcium ion jut a sejtbe, amely a belső raktárakból nagy mennyiségű további kalciumot szabadít fel, és különböző biokémiai mechanizmusokat, lebontó enzimeket aktivál (Rasmussen, 1986). Ezek károsítják a citoszkelletont, a mitokondriumokat, ezzel a sejt energetikai rendszerét, valamint az axonális transzportot és a DNS-t. Ez a sejt degenerációjához vezethet. A magas kalcium ion szint aktiválhat egy speciális sejtpusztítási mechanizmust is, ahol a megfelelő enzimkészlet jelen van, amelyet programozott sejthalálnak vagy apoptózisnak nevezünk (Gavrieli *et al.*, 1992; Bonfoco *et al.*, 1995). Ez a sejt DNS-ének feldarabolódásához vezet, azonos típusú sejtekben azonos idő alatt. Epilepszia modellekben bizonyították, hogy ez a mechanizmus felelős a CA1 régió piramisneuronjainak pusztulásáért (Pollard *et al.*, 1994).

Felmerül a kérdés, hogy a sejtpusztulás és rostsarjadzás különböző mértéke szklerotikus- nem-szklerotikus a betegség különböző fázisait jelöli-e, és vajon az enyhébb sejtpusztulást mutató típusok idővel átalakulnak-e a súlyosabb sejtpusztulást mutató patológias formákká. Mivel a betegeket egy adott időpontban operálták meg, csak ezt az egy állapotukat ismerjük.

Megvizsgáltuk, hogy a sejtpusztulás mértéke korrelál-e az epilepszia fennállásának időtartamával, és azt találtuk, hogy nincs egyértelmű összefüggés. A temporális lebeny eredetű epilepsziának számos modellje van, melyekben különböző sejtpusztulási mintázat alakul ki. A hippocampális sclerosis legjobban a káinsav-kiváltotta epilepszia, vagy a pilocarpinos modell reprezentálja (Hablitz *et al.*, 1992; Ben-Ari & Cossart, 2000). Azonban a gerjesztéses (kindling) modell is a TLE modellje, és ebben nem alakul ki sclerosis (McNamara, 1984; Represa *et al.*, 1989).

Modellkísérletek adatai alapján a principális neuronok a scleroticussá váló állapotokban apoptotikusan pusztulnak, mely a programozott sejthalál egyik megfelelője, és bizonyos mennyiségű sejtbe belépő kalcium ion váltja ki az érzékeny – megfelelő enzimkészlettel rendelkező – sejtekben (Olney, 1990). Az axonsarjadzás, és az érzékeny interneuronok pusztulása viszont megfigyelhető azokban az epilepszia modellekben is, ahol sclerosis nem alakul ki. A principális neuronok pusztulása tehát egy meghatározott mennyiségű túlszaporodás hatására bekövetkező kalciumszint emelkedés függvényének tűnik. Ez megtörténhet az epilepsziás rohamok során bármikor, az első roham idején épp úgy, mint húsz év múlva. Nem törvényszerű, hogy az enyhébb sejtpusztulást mutató típusok idővel súlyosabbá váljanak, de bármikor előfordulhat. Az epilepsziás reorganizáció egyéb jelenségei viszont – axonsarjadzás vagy transzmitter szintek, receptorok változásai – valószínűleg az elektromos aktivitás megnövekedése következtében jönnek létre, és minden patológiai típusban megfigyelhetők (Maglóczy, 2005; Maglóczy, 2010).

Igy kijelenthetjük, hogy az axonsarjadzás a az epilepsziás reorganizáció sokkal általánosabb jelensége, mint a sejtpusztulás. Az axonsarjadzás és a neuronok kapcsolatainak átrendeződése önmagában is képes lehet rohamokat generálni, ha a neuronok nem pusztulnak el.

Ráadásul, a piramisneuronok pusztulását tapasztaltuk elektronmikroszkópos mintáinkban olyan betegeken, akiknél ez fénymikroszkóppal nem látszott (Wittner *et al.*, 2005). A nem-szklerotikus betegek hippocampusában sem „ép”, jelentős szinaptikus reorganizáció és nem elhanyagolható sejtpusztulás játszódott le benne, és mivel még vannak ép vetítő kapcsolatai más agyterületek felé

felé az életben maradt sejtektől, még könnyebben terjesztheti, és még több területre az epilepsziás aktivitást.

Figyelembe véve a reorganizációs eredményeket, érdemes olyan neuronhálózati elemeket választani terápiás célpontnak, mely kulcsszerepet játszik a neuronhálózat szabályozásában. Az eredmények azt sugallják, hogy a CR-tartalmú sejtek megóvása az epilepszia korai fázisában megakadályozná a dendritikus gátlás összeomlását, és megóvhatná a hálózatot a kóros szinkronizációtól.

VI. Köszönetnyilvánítás:

Köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik munkájukkal hozzájárultak az eredmények létrejöttéhez. Elsősorban Freund Tamás professzornak, aki egyetemi hallgató korom óta tanítómesterem, és aki mindenben támogatott munkám végzése során.

Az értekezésben foglalt munkát több tanítványommal együtt végeztük. Köszönöm Wittner Lucának, Tóth Kingának és Karlócai Ritának a közös munkát, lelkesedésüket, kitartásukat, a téma iránti elkötelezettségüket, és hogy mindig öröm volt dolgozni velük

Köszönettel tartozom számos kollégának akikkel kollaborációban dolgoztam: Borhegyi Zsoltnak, Buzsáki Györgynek, Fabó Dánielnek, Halász Péternek, Juhász Gábornak, Katona Istvánnak, Ludányi Anikónak, Ulbert Istvánnak akikkel csodálatos élménnyé vált a tudományos munka. Rengeteget segítettek munkámban a KOKI munkatársai is, elsősorban Barthó Péter, Mátyás Ferenc, Kovács Krisztina, Madarász Emília, Varga Viktor, Hájos Norbert, Hrabovszki Erik, Rancz Ede, Slézia Andrea, akikhez mindig fordulhattam, ha egy problémát nem tudtam megoldani.

Köszönetet szeretnék mondani Palkovits Miklós és Sótonyi Péter professzoroknak a kontroll humán hippocampus minták biztosításáért.

A projectben dolgozó számos orvosnak is köszönöm, hogy együtt dolgoztak velem: elsősorban Altmann Annának, Juhos Verának, Jerney Juditnak, Erőss Lorándnak, Rásonyi Györgynek, Czirják Sándornak, Vajda Jánosnak, Szabó Zseréndnek, de a következő intézmények mindazon orvosainak és dolgozóinak is, akik elősegítették a projectben végzett munkát: Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet Epilepszia Centrum, Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet, MRE Bethesda Gyermekkorház, Neurológiai Osztály, Heim Pál Kórház, Járóbeteg Epilepszia Centrum, Szent István Kórház, Neurológia Osztály, MÁV Kórház, Budapest, Ideggyógyászati és Idegsebészeti Osztály.

A gyakorlati kivitelezés lehetetlen lett volna a kiváló technikai segítség nélkül. Iványi Katalin, Lengyel Katalin, Széles Csilla, Szépné Simon Emőke, Goda Győző, Bucsánszki Miklós és Wolf György segítőkészségét köszönöm.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönetet mondok szüleimnek, öcsémnek és családjának, valamint férjemnek, mert mindig mindenben mellettem álltak, bíztak bennem és szerettek. Köszönöm.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

Az epilepsziás rohamokat sok sejt szinkron kisülése okozza, melyért a legvalószínűbb hipotézis szerint az elégtelen gátlás felelős. A principális sejtek aktivitását lokális gátló interneuronok szabályozzák, melyek három funkcionális csoportba sorolhatók. 1. periszomatikus gátlósejtek, melyek a principális sejtek sejttestén és proximális szegmentumán (kosársejtek,) vagy axon iniciális szegmentumán (axo-axonikus sejtek) végződnek, ezek a hippocampusban parvalbumint (PV) vagy kolekisztokinint (CCK) tartalmaznak. 2. Dendritikus gátlósejtek, melyek a dendriteken végződnek, és számos neuropeptidet és calbindint (CB) tartalmaznak, substance P receptort (SPR) expresszálnak. 3. Valamint más interneuronokon végződő interneuron-szelektív sejtek, melyek patkányban calretinint (CR) tartalmaznak. Ezeket a sejteket emberi hippocampusban nem vagy nem elég részletesen vizsgálták, sem kontrollban, sem epilepsziás betegek hippocampusában, így szinaptikus reorganizációjukról és bemeneteik változásairól nem állt rendelkezésre elég adat ahhoz, hogy a principális sejtekre érkező gátlás és annak változásait megismerjük és megértsük. E nélkül viszont az epilepszia patomechanizmusa nem tárható fel, és nem lehet célzott, a neuronhálózat működését szabályozó gyógyszereket fejleszteni.

Ezért kifejlesztettünk egy olyan módszert, ami reprodukálhatóan jó minőségű immerziós fixálást tesz lehetővé kontroll és temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő terápiareszisztens betegek műtétileg eltávolított hippocampusán, és így elektronmikroszkópos kvantitatív vizsgálatokat tesz lehetővé a szinaptikus reorganizáció feltárására.

Ezzel a módszerrel hasonlítottuk össze a kontroll post mortem alanyok és szklerotikus és nem-szklerotikus hippocampális patológiával rendelkező epilepszia betegek agyában a funkcionálisan különböző típusú gátlósejteket, úgy, hogy immunfestést végeztünk az azokat jelölő neurokémiai markerek ellen.

A neuronhálózat jelentős átalakulását találtuk, úgy szklerotikus mint nem-szklerotikus betegekben. A PV-tartalmú gátló bemenet megerősödik a szemcsesejtek axon iniciális szegmentumán, de sejttestjén nem, a CCK-tartalmú sejtek axonja sarjadzik a gyrus dentátusban, az SPR-kifejező sejtek dendritikus sarjadzást mutatnak a szklerotikus gyrus dentatusban és a nem-szklerotikus CA1-ben, a CR-tartalmú sejtek pedig, melyekről bizonyítottuk, hogy az emberi hippocampusban részt vesznek a dendritikus és interneuron-szelektív gátlásban, elpusztulnak és dendritikus hálózatuk összeomlik. A CB-tartalmú sejtek axonja is sarjadzik, és nagyobb arányban végződik életben maradó interneuronokon epilepsziás hippocampusban, mint kontrollban, növelve ezzel a gátlósejtek gátlását.

Mindez a dendritikus gátlás meggyengüléséhez és a periszomatikus gátlás megerősödéséhez vezet, mely növeli a hálózat szinkron működésének valószínűségét, különösen mivel több serkentő pálya is sarjadzik, és nő a principális sejtek serkentő bemenete is. Vizsgálataink rámutatnak, hogy a sarjadzás sokkal általánosabb jelensége az epilepsziás reorganizációnak, mint asejtpusztulás, és már a nem-szklerotikus hippocampusokban is jelen van, és elősegíti az epilepsziás rohamokat.

Eredményeink azt sugallják, hogy az általunk vizsgált temporális epilepsziás betegekben a gátló neuronhálózatok olyan mértékben átalakultak és a dendritikus és periszomatikus gátlás egyensúlya annyira eltolódott, hogy általános GABAerg rendszereket segítő terápia már nem biztos, hogy gátolja a sejtek szinkron kisülését. A gátló neuronhálózatok, és különösen a periszomatikus gátlás megerősödése egyik oka lehet annak, hogy ezek a betegek terápierezisztensek voltak, és olyan terápiát igényelnének, mely célzottan a dendritikus gátlást erősíti.

VIII. Idézett irodalom

- Acsady, L., Arabadzisz, D. & Freund, T.F. (1996) Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience*, **73**, 299-315.
- Amaral, D.G. (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, **182**, 851-914.
- Amaral, D.G., Insausti, R. & Cowan, W.M. (1984) The commissural connections of the monkey hippocampal formation. *The Journal of comparative neurology*, **224**, 307-336.
- Amaral DG, I.R. (1990) Hippocampal formation. In G., P. (ed.) *The Human Nervous System*, Academic Press, San Diego, CA, pp. 711-755.
- Amaral, D.G., Ishizuka, N. & Claiborne, B. (1990) Neurons, Numbers and the Hippocampal Network. *Understanding the Brain Through the Hippocampus*, **83**, 1-11.
- Amaral, D.G. & Witter, M.P. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, **31**, 571-591.
- Avoli, M. (1991) Excitatory amino acid receptors in the human epileptogenic neocortex. *Epilepsy research*, **10**, 33-40.
- Babb, T.L. (1999) Synaptic reorganizations in human and rat hippocampal epilepsy. *Adv Neurol*, **79**, 763-779.
- Babb, T.L., Brown, W.J., Pretorius, J., Davenport, C., Lieb, J.P. & Crandall, P.H. (1984) Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, **25**, 729-740.
- Babb, T.L., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Crandall, P.H. & Levesque, M.F. (1991) Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience*, **42**, 351-364.
- Babb, T.L., Pretorius, J.K., Kupfer, W.R. & Crandall, P.H. (1989) Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci*, **9**, 2562-2574.
- Ben-Ari, Y. (1987) Brain damage caused by seizure activity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*, **39**, 209-211.
- Ben-Ari, Y. (2001) Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia*, **42**, 5-7.
- Ben-Ari, Y. & Cossart, R. (2000) Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci*, **23**, 580-587.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., Moshe, S.L., Nordli, D., Plouin, P. & Scheffer, I.E. (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, **51**, 676-685.
- Best, N., Mitchell, J., Baimbridge, K.G. & Wheal, H.V. (1993) Changes in parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. *Neurosci.Lett.*, **155**, 1-6.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P. & Lipton, S.A. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D- aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **92**, 7162-7166.
- Borhegyi, Z. & Leranth, C. (1997) Distinct substance P- and calretinin-containing projections from the supramammillary area to the hippocampus in rats; a species difference between rats and monkeys. *Exp.Brain Res.*, **115**, 369-374.
- Chan-Palay, V. (1987) Somatostatin immunoreactive neurons in the human hippocampus and cortex shown by immunogold/silver intensification on vibratome sections: coexistence with neuropeptide Y neurons, and effects in Alzheimer-type dementia. *J Comp Neurol*, **260**, 201-223.
- Chan-Palay, V., Kohler, C., Haesler, U., Lang, W. & Yasargil, G. (1986) Distribution of neurons and axons immunoreactive with antisera against neuropeptide Y in the normal human hippocampus. *J Comp Neurol*, **248**, 360-375.
- Choi, D.W. (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol*, **23**, 1261-1276.
- Cohen, I., Navarro, V., Clemenceau, S., Baulac, M. & Miles, R. (2002) On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science*, **298**, 1418-1421.
- Corsellis, J.A.N. & Meldrum, B.S. (1976) Epilepsy. In Blackwood, W., Corsellis, J.A.N. (eds.) *Greenfield's Neuropathology*. Arnold, London, pp. 771-795.

- Cossart, R., Dinocourt, C., Hirsch, J.C., Merchan-Perez, A., De Felipe, J., Ben-Ari, Y., Esclapez, M. & Bernard, C. (2001) Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci*, **4**, 52-62.
- de Lanerolle, N.C., Brines, M., Williamson, A., Kim, J.H. & Spencer, D.D. (1992) Neurotransmitters and their receptors in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Suppl*, **7**, 235-250.
- de Lanerolle, N.C., Kim, J.H., Robbins, R.J. & Spencer, D.D. (1989) Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res*, **495**, 387-395.
- de Lanerolle, N.C., Sloviter, R.S., Kim, J.H., Robbins, R.J. & Spencer, D.D. (1988) Evidence for hippocampal interneuron loss in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, **29**, 674.
- DeFelipe, J. (1999) Chandelier cells and epilepsy. *Brain*, **122**, 1807-1822.
- DeFelipe, J., Garcia Sola, R., Marco, P., del Rio, M.R., Pulido, P. & Ramon y Cajal, S. (1993) Selective changes in the microorganization of the human epileptogenic neocortex revealed by parvalbumin immunoreactivity. *Cereb Cortex*, **3**, 39-48.
- Duvernoy, H.M. (1998) *The human hippocampus*. Springer-Verlag, Berlin.
- Engel, J., Jr. (1996) Excitation and inhibition in epilepsy. *Can J Neurol Sci*, **23**, 167-174.
- Falconer, M., Serafetinides, E. & Corsellis, J.A.N. (1964) Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol*, **10**, 233-248.
- Falconer, M.A. & Taylor, D.C. (1968) Surgical treatment of drug-resistant epilepsy due to mesial temporal sclerosis. Etiology and significance. *Arch Neurol*, **19**, 353-361.
- Faught, E. (1999) Epidemiology and drug treatment of epilepsy in elderly people. *Drugs Aging*, **15**, 255-269.
- Fisher, R.S., Pedley, T.A., Moody, W.J., Jr. & Prince, D.A. (1976) The role of extracellular potassium in hippocampal epilepsy. *Arch Neurol*, **33**, 76-83.
- Franck, J.E., Pokornny, J., Kunkel, D.D. & Schwartzkroin, P.A. (1995) Physiologic and morphologic characteristics of granule cell circuitry in human epileptic hippocampus. *Epilepsia*, **36**, 543-558.
- Freund, T.F. & Buzsaki, G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, **6**, 347-470.
- Freund, T.F. & Katona, I. (2007) Perisomatic inhibition. *Neuron*, **56**, 33-42.
- Freund, T.F., Ylinen, A., Miettinen, R., Pitkanen, A., Lahtinen, H., Baimbridge, K.G. & Riekkinen, P.J. (1992) Pattern of neuronal death in the rat hippocampus after status epilepticus. Relationship to calcium binding protein content and ischemic vulnerability. *Brain Res Bull*, **28**, 27-38.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, **119**, 493-501.
- Gloor, P., Salanova, V., Olivier, A. & Quesney, L.F. (1993) The human dorsal hippocampal commissure. An anatomically identifiable and functional pathway. *Brain*, **116** (Pt 5), 1249-1273.
- Green, R.C. (1991) Neuropathology and behavior in epilepsy *Epilepsy and Behavior*. Wiley-Liss, Inc., pp. 345-359.
- Gulyas, A.I., Hajos, N. & Freund, T.F. (1996) Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci*, **16**, 3397-3411.
- Gumnit, R.J. (1983) *The epilepsy handbook. The practical management of seizures*. Raven Press, New York.
- Hablitz, J.J., Ben-Ari, Y., Gutnick, Mody, I., Snead, O.C., Cherubini, E., Pumain, R., Prince, D.A., Engel, J., Jasper, H.H., Fariello, R.G., Marescaux, C., Avanzini & Gale (1992) Chronic models and human epilepsy - general discussion. *Epilepsy Res.*, 393-395.
- Halasy, K., Buhl, E.H., Lorinczi, Z., Tamas, G. & Somogyi, P. (1996) Synaptic target selectivity and input of GABAergic basket and bistratified interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus*, **6**, 306-329.
- Halász, P. & Rajna, P. (1990) *Epilepszia*. Innomark, Budapest.
- Houser, C.R. (1990) Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res*, **535**, 195-204.
- Houser, C.R. (1991) GABA neurons in seizure disorders: a review of immunocytochemical studies. *Neurochem Res*, **16**, 295-308.
- Houser, C.R., Miyashiro, J.E., Swartz, B.E., Walsh, G.O., Rich, J.R. & Delgado-Escueta, A.V. (1990) Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J Neurosci*, **10**, 267-282.
- Huberfeld, G., Wittner, L., Clemenceau, S., Baulac, M., Kaila, K., Miles, R. & Rivera, C. (2007) Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *The Journal of neuroscience*, **27**, 9866-9873.

- Hughes, P.E., Alexi, T., Walton, M., Williams, C.E., Dragunow, M., Clark, R.G. & Gluckman, P.D. (1999) Activity and injury-dependent expression of inducible transcription factors, growth factors and apoptosis-related genes within the central nervous system. *Prog Neurobiol*, **57**, 421-450.
- Isokawa, M. & Mello, L.E. (1991) NMDA receptor-mediated excitability in dendritically deformed dentate granule cells in pilocarpine-treated rats. *Neurosci Lett*, **129**, 69-73.
- Jankowsky, J.L. & Patterson, P.H. (2001) The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol*, **63**, 125-149.
- Johansen, F.F., Tonder, N., Zimmer, J., Baimbridge, K.G. & Diemer, N.H. (1990) Short-term changes of parvalbumin and calbindin immunoreactivity in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, **120**, 171-174.
- Kamphuis, W., Huisman, E., Wadman, W.J., Heizmann, C.W. & daSilva, H.L. (1989) Kindling induced changes in parvalbumin immunoreactivity in rat hippocampus and its relation to long-term decrease in GABA-immunoreactivity. *Brain Res.*, **479**, 23-34.
- Karlocai, M.R., Toth, K., Watanabe, M., Ledent, C., Juhasz, G., Freund, T.F. & Magloczky, Z. (2011) Redistribution of CB1 Cannabinoid Receptors in the Acute and Chronic Phases of Pilocarpine-Induced Epilepsy. *PLoS One*, **6**, e27196.
- Katona, I., Sperlagh, B., Magloczky, Z., Santha, E., Kofalvi, A., Czirjak, S., Mackie, K., Vizi, E.S. & Freund, T.F. (2000) GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience*, **100**, 797-804.
- Kosaka, T., Katsumaru, H., Hama, K., Wu, J.Y. & Heizmann, C.W. (1987) GABAergic neurons containing the Ca²⁺-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res*, **419**, 119-130.
- League, C.o.C.a.T.o.t.I. & Epilepsy, A. (1989) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, **30**, 389-399.
- Lee, S., Williamson, J., Lothman, E.W., Szele, F.G., Chesselet, M.F., Von Hagen, S., Sapolsky, R.M., Mattson, M.P. & Christakos, S. (1997) Early induction of mRNA for calbindin-D28k and BDNF but not NT-3 in rat hippocampus after kainic acid treatment. *Brain research*, **47**, 183-194.
- Lehmann, T.N., Gabriel, S., Eilers, A., Njunting, M., Kovacs, R., Schulze, K., Lanksch, W.R. & Heinemann, U. (2001) Fluorescent tracer in pilocarpine-treated rats shows widespread aberrant hippocampal neuronal connectivity. *Eur J Neurosci*, **14**, 83-95.
- Lehmann, T.N., Gabriel, S., Kovacs, R., Eilers, A., Kivi, A., Schulze, K., Lanksch, W.R., Meencke, H.J. & Heinemann, U. (2000) Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsia*, **41**, S190-194.
- Leppik, I.E. (2007) Epilepsy in the elderly: scope of the problem. *International review of neurobiology*, **81**, 1-14.
- Lewis, D.V. (2005) Losing neurons: selective vulnerability and mesial temporal sclerosis. *Epilepsia*, **46 Suppl 7**, 39-44.
- Liu, H., Mazarati, A.M., Katsumori, H., Sankar, R. & Wasterlain, C.G. (1999) Substance P is expressed in hippocampal principal neurons during status epilepticus and plays a critical role in the maintenance of status epilepticus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5286-5291.
- Liu, H., Sankar, R., Shin, D.H., Mazarati, A.M. & Wasterlain, C.G. (2000) Patterns of status epilepticus-induced substance P expression during development. *Neuroscience*, **101**, 297-304.
- Lloyd, K.G., Bossi, L., Morselli, P.L., Munari, C., Rougier, M. & Loiseau, H. (1986) Alterations of GABA-mediated synaptic transmission in human epilepsy. *Adv Neurol*, **44**, 1033-1044.
- Lotstra, F. & Vanderhaeghen, J.J. (1987) Distribution of immunoreactive cholecystokinin in the human hippocampus. *Peptides*, **8**, 911-920.
- Magloczky, Z. (2010) Sprouting in human temporal lobe epilepsy: excitatory pathways and axons of interneurons. *Epilepsy research*, **89**, 52-59.
- Maglóczky, Z. (2005) A hippocampális neuronhálózatok átalakulása krónikus temporális lebeny epilepsiában. In Halász, P. (ed.) *Hippocampus, mint neuropszichiátriai betegségek közös nevezője*. Melinda Kiadó, Budapest, pp. 61-101.
- Magloczky, Z., Acsady, L. & Freund, T.F. (1994) Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus*, **4**, 322-334.
- Magloczky, Z. & Freund, T.F. (1993) Selective neuronal death in the contralateral hippocampus following unilateral kainate injections into the CA3 subfield. *Neuroscience*, **56**, 317-335.
- Magloczky, Z. & Freund, T.F. (1995) Delayed cell death in the contralateral hippocampus following kainate injection into the CA3 subfield. *Neuroscience*, **66**, 847-860.

- Maglóczy, Z., Halasz, P., Vajda, J., Czirjak, S. & Freund, T.F. (1997) Loss of Calbindin-D28K immunoreactivity from dentate granule cells in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, **76**, 377-385.
- Maglóczy, Z., Toth, K., Karlocai, R., Nagy, S., Eross, L., Czirjak, S., Vajda, J., Rasonyi, G., Kelemen, A., Juhos, V., Halasz, P., Mackie, K. & Freund, T.F. (2010) Dynamic changes of CB1-receptor expression in hippocampi of epileptic mice and humans. *Epilepsia*, **51 Suppl 3**, 115-120.
- Maglóczy, Z., Wittner, L., Borhegyi, Z., Halasz, P., Vajda, J., Czirjak, S. & Freund, T.F. (2000) Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience*, **96**, 7-25.
- Maglóczy, Z., Wittner, L., Borhegyi, Z., Halász, P., Vajda, J., Czirják, S. & Freund, T.F. (2000) Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience*, **96**, 7-25.
- Mantyh, P.W., Allen, C.J., Ghilardi, J.R., Rogers, S.D., Mantyh, C.R., Liu, H., Basbaum, A.I., Vigna, S.R. & Maggio, J.E. (1995) Rapid endocytosis of a G protein-coupled receptor: substance P-evoked internalization of its receptor in the rat striatum in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **92**, 2622-2626.
- Marco, P., Sola, R.G., Cayal, S.R.Y. & DeFelipe, J. (1997) Loss of inhibitory synapses on the soma and axon initial segment of pyramidal cells in human epileptic peritumoral neocortex: implications for epilepsy. *Brain Res.Bull.*, **44**, 47-66.
- Margerison, J.H. & Corsellis, J.A. (1966a) Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain*, **89**, 499-530.
- Margerison, J.H. & Corsellis, J.A.N. (1966b) Epilepsy and the temporal lobe. *Brain*, **89**, 499-530.
- Mathern, G.W., Babb, T.L., Micevych, P.E., Blanco, C.E. & Pretorius, J.K. (1997) Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Mol.Chem.Neuropathol.*, **30**, 53-76.
- Mathern, G.W., Babb, T.L., Pretorius, J.K. & Leite, J.P. (1995) Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. *J Neurosci*, **15**, 3990-4004.
- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Leite, J.P., Kornblum, H.I., Mendoza, D., Lozada, A. & Bertram, E.H., 3rd (1998a) Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res*, **32**, 154-171.
- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Mendoza, D., Leite, J.P., Chimelli, L., Born, D.E., Fried, I., Assirati, J.A., Ojemann, G.A., Adelson, P.D., Cahan, L.D. & Kornblum, H.I. (1999) Hippocampal N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Ann Neurol*, **46**, 343-358.
- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Mendoza, D., Lozada, A., Leite, J.P., Chimelli, L., Fried, I., Sakamoto, A.C., Assirati, J.A. & Adelson, P.D. (1998b) Increased hippocampal AMPA and NMDA receptor subunit immunoreactivity in temporal lobe epilepsy patients. *J Neuropathol Exp Neurol*, **57**, 615-634.
- McNamara, J.O. (1984) Kindling: an animal model of complex partial epilepsy. *Ann Neurol*, **16**, S72-76.
- Meldrum, B. (1991) Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res*, **10**, 55-61.
- Meldrum, B.S. (1990) Anatomy, physiology, and pathology of epilepsy. *Lancet*, **336**, 231-234.
- Miles, R., Toth, K., Gulyas, A.I., Hajos, N. & Freund, T.F. (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron*, **16**, 815-823.
- Miller, L.A., Munoz, D.G. & Finmore, M. (1993) Hippocampal sclerosis and human memory. *Arch Neurol*, **50**, 391-394.
- Nagerl, U.V., Mody, I., Jeub, M., Lie, A.A., Elger, C.E. & Beck, H. (2000) Surviving granule cells of the sclerotic human hippocampus have reduced Ca(2+) influx because of a loss of calbindin-D(28k) in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*, **20**, 1831-1836.
- Nitsch, R. & Leranth, C. (1993) Calretinin immunoreactivity in the monkey hippocampal formation. II: Intrinsic GABAergic and hypothalamic nonGABAergic systems. An experimental tracing and coexistence study. *Neuroscience*, **55**, 797-812.
- Nitsch, R. & Ohm, T.G. (1995) Calretinin immunoreactive structures in the human hippocampal formation. *J.Comp.Neurol.*, **360**, 475-487.
- Nó, L.d. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the Ammonic system. *J. für Psychologie und Neurologie*, **46**.

- Olney, J.W. (1978) Neurotoxicity of excitatory amino acids. In McGeer, E., Olney, J.W., McGeer, P. (eds.) *Kainic acid as a tool in neurobiology*. Raven Press, New York, pp. 95-121.
- Olney, J.W. (1990) Excitotoxicity: an overview. *Can Dis Wkly Rep*, **16 Suppl 1E**, 47-57; discussion 57-48.
- Olney, J.W., Collins, R.C. & Sloviter, R.S. (1986) Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. In Delgado-Escueta, A., Ward, A., Woodbury, D., Porter, R. (eds.) *Basic mechanisms of the epilepsies: Molecular and cellular approaches*. Raven Press, New York, pp. 857-877.
- Olsen, R.W., Bureau, M., Houser, C.R., Delgado-Escueta, A.V., Richards, J.G. & Mohler, H. (1992) GABA/benzodiazepine receptors in human focal epilepsy. *Epilepsy Res Suppl*, **8**, 383-391.
- Peternel, S., Pilipovic, K. & Zupan, G. (2009) Seizure susceptibility and the brain regional sensitivity to oxidative stress in male and female rats in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **33**, 456-462.
- Pollard, H., Cantagrel, S., Charriaut-Marlangue, C., Moreau, J. & Ben Ari, Y. (1994) Apoptosis associated DNA fragmentation in epileptic brain damage. *Neuroreport*, **5**, 1053-1055.
- Rasmussen, H. (1986) The calcium messenger system. *N.Engl.J.Med.*, **314**, 1094-1101.
- Represa, A., Le Gall La Salle, G. & Ben-Ari, Y. (1989) Hippocampal plasticity in the kindling model of epilepsy in rats. *Neurosci Lett*, **99**, 345-350.
- Rocca, W.A., Sharbrough, F.W., Hauser, W.A., Annegers, J.F. & Schoenberg, B.S. (1987) Risk factors for complex partial seizures: a population-based case-control study. *Annals of Neurology*, **21**, 22-31.
- Rodin, E.A. (1968) *The prognosis of patient with epilepsy*. CC Thomas, Springfield, Illinois.
- Salzmann, A., Perroud, N., Crespel, A., Lamberg, C. & Malafosse, A. (2008) Candidate genes for temporal lobe epilepsy: a replication study. *Neurol Sci*, **29**, 397-403.
- Schwartzkroin, P.A. & Wheal, H.V. (1984) *Electrophysiology of epilepsy*. Academic Press, London.
- Scotti, A.L., Kalt, G., Bollag, O. & Nitsch, C. (1997) Parvalbumin disappears from GABAergic CA1 neurons of the gerbil hippocampus with seizure onset while its presence persists in the perforant path. *Brain Res*, **760**, 109-117.
- Seress, L. (1988) Interspecies comparison of the hippocampal formation shows increased emphasis on the regio superior in the Ammon's horn of the human brain. *J Hirnforsch*, **29**, 335-340.
- Seress, L. (2005) Az emberi hippocampus makroszkópos anatómiája, szövettani szerkezete, külső és belső kapcsolatai és fejlődése. In P., H. (ed.) *Hippocampus mint neuropszichiátriai betegségek közös nevezője*. Melinda kiadó, Budapest.
- Seress, L., Gulyas, A.I., Ferrer, I., Tunon, T., Soriano, E. & Freund, T.F. (1993) Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the human hippocampal formation. *J Comp Neurol*, **337**, 208-230.
- Seress, L., Gulyas, A.I. & Freund, T.F. (1991) Parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of the macaque monkey. *J Comp Neurol*, **313**, 162-177.
- Seress, L. & Mrzljak, L. (1987) Basal dendrites of granule cells are normal features of the fetal and adult dentate gyrus of both monkey and human hippocampal formations. *Brain Res*, **405**, 169-174.
- Seress, L. & Ribak, C.E. (1983) GABAergic cells in the dentate gyrus appear to be local circuit and projection neurons. *Exp Brain Res*, **50**, 173-182.
- Sloviter, R.S. (1989) Calcium-binding protein (Calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J.Comp.Neurol.*, **280**, 183-196.
- Sloviter, R.S., Sollas, A.L., Barbaro, N.M. & Laxer, K.D. (1991) Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J Comp Neurol*, **308**, 381-396.
- Sommer, W. (1880) Erkrankung des Ammonshornes als Aetiologisches Moment der Epilepsie. *Arch.Psychiat.NervKrankh*, **10**, 631-675.
- Somogyi, P., Nunzi, M.G., Gorio, A. & Smith, A.D. (1983) A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res.*, **259**, 137-142.
- Spencer, D.D. & Spencer, S.S. (1994) Hippocampal resections and the use of human tissue in defining temporal lobe epilepsy syndromes. *Hippocampus*, **4**, 243-249.
- Suckling, J., Roberts, H., Walker, M., Highley, J.R., Fenwick, P., Oxbury, J. & Esiri, M.M. (2000) Temporal lobe epilepsy with and without psychosis: exploration of hippocampal pathology including that in subpopulations of neurons defined by their content of immunoreactive calcium-binding proteins. *Acta Neuropathol (Berl)*, **99**, 547-554.

- Sundstrom, L.E., Brana, C., Gatherer, M., Mephram, J. & Rougier, A. (2001) Somatostatin- and neuropeptide Y-synthesizing neurones in the fascia dentata of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain*, **124**, 688-697.
- Sutula, T.P., Cascino, G., Cavazos, J.E. & Ramirez, L. (1989) Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann.Neurol.*, **26**, 321-330.
- Szabadics, J., Varga, C., Molnar, G., Olah, S., Barzo, P. & Tamas, G. (2006) Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science*, **311**, 233-235.
- Szente, M., Gajda, Z., Said Ali, K. & Hermes, E. (2002) Involvement of electrical coupling in the in vivo ictal epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the neocortex. *Neuroscience*, **115**, 1067-1078.
- Szirmai, I. (2001) *Neurológia*. Medicina, Budapest.
- Tang, F.R., Chia, S.C., Jiang, F.L., Ma, D.L., Chen, P.M. & Tang, Y.C. (2006) Calcium binding protein containing neurons in the gliotic mouse hippocampus with special reference to their afferents from the medial septum and the entorhinal cortex. *Neuroscience*, **140**, 1467-1479.
- Toth, K., Eross, L., Vajda, J., Halasz, P., Freund, T.F. & Maglóczy, Z. (2010) Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus. *Brain*, **133**, 2763-2777.
- Toth, K. & Freund, T.F. (1992) Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience*, **49**, 793-805.
- Toth, K., Wittner, L., Urban, Z., Doyle, W.K., Buzsaki, G., Shigemoto, R., Freund, T.F. & Maglóczy, Z. (2007) Morphology and synaptic input of substance P receptor-immunoreactive interneurons in control and epileptic human hippocampus. *Neuroscience*, **144**, 495-508.
- Urban, Z., Maglóczy, Z. & Freund, T.F. (2002) Calretinin-containing interneurons innervate both principal cells and interneurons in the CA1 region of the human hippocampus. *Acta Biol Hung*, **53**, 205-220.
- Wilson, C.L., Isokawa, M., Babb, T.L. & Crandall, P.H. (1990) Functional connections in the human temporal lobe. I. Analysis of limbic system pathways using neuronal responses evoked by electrical stimulation. *Exp Brain Res*, **82**, 279-292.
- Wittner, L., Eross, L., Czirjak, S., Halasz, P., Freund, T.F. & Maglóczy, Z. (2005) Surviving CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in the human epileptic hippocampus. *Brain*, **128**, 138-152.
- Wittner, L., Eross, L., Szabo, Z., Toth, S., Czirjak, S., Halasz, P., Freund, T.F. & Maglóczy, Z.S. (2002) Synaptic reorganization of calbindin-positive neurons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, **115**, 961-978.
- Wittner, L., Maglóczy, Z., Borhegyi, Z., Halasz, P., Toth, S., Eross, L., Szabo, Z. & Freund, T.F. (2001a) Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience*, **108**, 587-600.
- Wittner, L., Maglóczy, Z., Borhegyi, Z., Halász, P., Tóth, S., Eross, L., Szabó, Z. & Freund, T.F. (2001b) Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience*, **108**, 587-600.
- Zhu, Z.Q., Armstrong, D.L., Hamilton, W.J. & Grossman, R.G. (1997) Disproportionate loss of CA4 parvalbumin-immunoreactive interneurons in patients with Ammon's horn sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, **56**, 988-998.

IX. A doktori pályaműhöz felhasznált saját közlemények (Maglóczky Zsófia)

Zs. Maglóczky, P. Halász, J. Vajda, S. Czirják, and T.F. Freund (1997): Loss of Calbindin-D28k immunoreactivity from dentate granule cells in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 76:377-386

Maglóczky, Zs. Wittner, L., Borhegyi, Zs., Halász, P., Vajda, J., Czirják, S. and Freund, T.F. (2000): Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience*, 96: 7-25

Wittner L, Maglóczky Zs, Borhegyi Zs, Halász P, Tóth Sz, Erőss L, Szabó Z, Freund TF (2001) Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *NEUROSCIENCE* 108: pp. 587-600.

Urbán Z., Maglóczky Zs. and Freund T. F. (2002) Calretinin-containing interneurons innervate both principal cells and interneurons in the CA1 region of the human hippocampus. *Acta Biologica Hungarica* 53: 205-220.

L. Wittner, L. Erőss, Z. Szabó, Sz. Tóth, S. Czirják, P. Halász, T.F. Freund and Zs. Maglóczky (2002) Synaptic reorganization of calbindin-positive neurons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 115 (3):961-978.

Lucia Wittner, Loránd Erőss, Sándor Czirják, Péter Halász, Tamás F. Freund and Zsófia Maglóczky (2005) Surviving CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in the human epileptic hippocampus. *Brain*, **128**, 138-152.

Maglóczky Zs. A hippocampális neuronhálózatok átalakulása krónikus temporális lebeny epilepsziában.

In: Halász P (ed.) *Hippocampus, mint neuropszichiátriai betegségek közös nevezője*. Budapest: Melinda Kiadó, 2005. pp. 61-101.

Magloczky, Z. & Freund, T.F. (2005) Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. *Trends Neurosci*, **28**, 334-340.

Toth, K., Wittner, L., Urban, Z., Doyle, W.K., Buzsaki, G., Shigemoto, R., Freund, T.F. & Magloczky, Z. (2007) Morphology and synaptic input of substance P receptor-immunoreactive interneurons in control and epileptic human hippocampus. *Neuroscience*, **144**, 495-508.

Zsófia Maglóczky: Sprouting in human temporal lobe epilepsy: Excitatory pathways and axons of interneurons. *Epilepsy Research*, 89, 52-59. (2010)

Zsófia Maglóczky, Kinga Tóth, Rita Karlócai, Sára Nagy, Loránd Erőss, Sándor Czirják, János Vajda, György Rásonyi, Anna Kelemen, Vera Juhos, Péter Halász, Ken Mackie, Tamás 187

F. Freund: Dynamic changes of CB1 receptor expression in hippocampi of epileptic mice and humans. *Epilepsia*, 51(Suppl. 39: 115-120, (2010)

Kinga Tóth, Loránd Erőss, János Vajda, Péter Halász, Tamás F. Freund and Zsófia Maglóczy: Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus. *Brain*, 133; 2763-77 (2010)

Karlocai MR, Toth K, Watanabe M, Ledent C, Juhasz G, Freund TF, Magloczky Z (2011) Redistribution of CB1 Cannabinoid Receptors in the Acute and Chronic Phases of Pilocarpine-Induced Epilepsy. *PLOS ONE* 6:(11) p. e27196. (2011)

X. A pályaműhöz fel nem használt, epilepsziával foglalkozó cikkek

Katona I., Sperlág B., Maglóczy Zs., Sántha E., Köfalvi A., Czirják S., Mackie K., Vizi E.S., Freund T.F. (2000): GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience*, 100: 797-804

István Ulbert, Zsófia Maglóczy, Loránd Erőss, Sándor Czirják, János Vajda, László Bognár, Szabolcs Tóth, Zsolt Szabó, Péter Halász, Dániel Fabó, Eric Halgren, Tamás F. Freund, George Karmos (2004) In vivo laminar electrophysiology co-registered with histology in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Experimental Neurology*, 187(2):310-8.

Slézia, A. K. Kékesi, T. Szikra, A. M. Papp, K. Nagy, M. Szenté, Zs. Maglóczy, T. F. Freund and G. Juhász (2004): Uridine release during aminopyridine-induced epilepsy. *Neurobiology of Disease*, 16: 490-499 (2004)

Fabó D, Magloczky Z, Wittner L, Pek A, Eross L, Czirjak S, Vajda J, Solyom A, Rasonyi G, Szucs A, Kelemen A, Juhos V, Grand L, Dombovari B, Halasz P, Freund TF, Halgren E, Karmos G, Ulbert I. Properties of in vivo interictal spike generation in the human subiculum. *BRAIN* **131**:(Pt 2) 485-499 (2008)

Ludanyi A, Eross L, Czirjak S, Vajda J, Halasz P, Watanabe M, Palkovits M, Magloczky Z, Freund TF, Katona I. Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. *J NEUROSCI* 28:(12) 2976-2990 (2008)

Wittner L, Huberfeld G, Clemenceau S, Eross L, Dezamis E, Entz L, Ulbert I, Baulac M, Freund TF, Magloczky Z, Miles R The epileptic human hippocampal cornu ammonis 2 region generates spontaneous interictal-like activity in vitro *BRAIN* 132:(Pt 11) 3032-3046 (2009)

Richárd Csercsa, Balázs Dombovári, Dániel Fabó, Lucia Wittner, Loránd Erőss, László Entz, András Solyom, György Rasonyi, Anna Szűcs, Anna Kelemen, Rita Jakus, Vera Juhos, László Grand, Andor Magony, Péter Halász, Tamás F. Freund, Zsófia Maglóczy, Sydney S. Cash,

László Papp, György Karmos, Eric Halgren and István Ulbert: Laminar analysis of the slow wave activity in humans. *Brain* 133;2814-2829, (2010)

Ludányi A, Hu SS, Yamazaki M, Tanimura A, Piomelli D, Watanabe M, Kano M, Sakimura K, Maglóczy Z, Mackie K, Freund TF, Katona I. (2011)
Complementary synaptic distribution of enzymes responsible for synthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the human hippocampus.
Neuroscience. 174:50-63.